 DOI : 10.35311/jmpi.v10i1.484

Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Fraksi Ekstrak Daun Gamal (*Gliricidia Sepium* (Jacq Walp)) Terhadap *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923

Herman*, Titik Sunarni, Opstaria Saptarini

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta

Sitasi: Herman, Sunarni, T., & Saptarini, O. (2024). Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Fraksi Ekstrak Daun Gamal (*Gliricidia Sepium* (Jacq Walp)) Terhadap *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 10(1), 314-327. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v10i1.484>

Submitted: 28 Februari 2024

Accepted: 16 April 2024

Published: 30 Juni 2024

*Penulis Korespondensi:

Herman

Email:

hermannh615@gmail.com



Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

ABSTRAK

Daun gamal (*Gliricidia sepium* (Jacq Walp)) di dalamnya terkandung zat flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid. Senyawa dalam daun gamal mempunyai sifat uang antibakteri. Tujuan dari penelitian ini yakni untuk mengetahui bagaimana peran ekstrak serta fraksi n-heksana, etil asetat, serta air terhadap aktivitas antibakteri dengan menghambat pembentukan dan degradasi biofilm. Metode maserasi digunakan untuk mengekstraksi daun gamal menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak kental dilakukan fraksinasi dengan pelarut n-heksana, air, serta etil asetat. Uji aktivitas antibakteri dilaksanakan melalui metode dilusi dilanjutkan observasi pengaruh kerja melalui uji AAS kebocoran ion. Uji aktivitas antibiofilm menggunakan alat microplate serta pembacaannya dilaksanakan pada panjang gelombang 595 nm. Hasil penelitian bahwa fraksi etil asetat daun gamal teraktif terhadap bakteri *S. aureus*. Fraksi etil asetat daung gamal dapat merusak pada membran sel bakteri. Rata-rata persentase penghambatan pembentukan biofilm terhadap *S. aureus* terbesar di konsentrasi 50%, yaitu fraksi etil asetat sebanyak 40,69%, ekstrak 37,51%, fraksi n-heksana 28,93% dan fraksi air 30,20%, sedangkan rata-rata persentase degradasi biofilm terlihat yang tertinggi adalah fraksi etil asetat dengan konsentrasi 50% yaitu sebesar 37,27%, ekstrak 34,55%, fraksi air 31,77%, fraksi n-heksan nilai 30,05%. Kontrol positif (Tetrasiklin) memiliki aktivitas dengan nilai 51,66 %.

Kata Kunci: Antibakteri, Kebocoran Ion, Antibiofilm, Daun Gamal, *S. Aureus*

ABSTRACT

Gamal leaves (*Gliricidia sepium* (Jacq Walp)) contain flavonoids, alkaloids, tannins, saponins, and terpenoids. Compounds in gamal leaves have antibacterial properties. The purpose of this study is to find out how the role of extracts and fractions of n-hexane, ethyl acetate, and water on antibacterial activity by inhibiting biofilm formation and degradation. Maceration method was used to extract gamal leaves using 96% ethanol solvent. The thick extract was fractionated using n-hexane, water, and ethyl acetate solvents. The antibacterial activity test was carried out by dilution method followed by observation of the effect of work with ion leakage AAS test. The antibiofilm activity test used a microplate device and the readings were taken at a wavelength of 595 nm. The results showed that the ethyl acetate fraction of gamal leaves was most active against *S. aureus* bacteria. The ethyl acetate fraction of gamal leaves can damage the bacterial cell membrane. The average percentage of inhibition of biofilm formation against *S. aureus* is highest at a concentration of 50%, namely the ethyl acetate fraction of 40.69%, extract 37.51%, n-hexane fraction 28.93% and water fraction 30.20%, while the average percentage of biofilm degradation seen the highest is the ethyl acetate fraction with a concentration of 50% which is 37.27%, extract 34.55%, water fraction 31.77%, n-hexane fraction value 30.05%. The positive control (Tetracycline) has activity with a value of 51.66%.

Keywords: Antibacterial, Ion Leakage, Antibiofilm, Gamal Leaf, *S. aureus*

PENDAHULUAN

Salah satu dari faktor penyebab terjadinya infeksi adalah bakteri yang merupakan fenomena yang paling banyak terjadi dikalangan masyarakat, tak terkecuali pada wilayah negara berkembang seperti Indonesia (Katrin *et al.*, 2015). Bakteri *S. aureus* dapat menyebabkan banyak penyakit peradangan dan biofilm yang terkait dengan infeksi

serta resistensi antibiotik (Ahn *et al.*, 2018). Kemampuan yang dimiliki oleh bakteri *S. aureus* adalah dapat melekat dipermukaan benda serta membentuk biofilm (Matilla *et al.*, 2020) yang mayoritas mampu dikendalikan melalui pembuatan *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA).

Bakteri *S. aureus* dapat membentuk biofilm yang dapat menetralkan suhu, keasaman, dan faktor

lingkungan lainnya juga mampu dijadikan pelindung bagi bakteri dari pertahanan tubuh inangnya (Kining *et al.*, 2016). Pembentukan biofilm meningkatkan kemungkinan kontaminasi silang dan infeksi mikroorganisme yang lebih parah (Coughlan *et al.*, 2016). Di masa sekarang, biofilm dianggap menjadi mediator utama infeksi, dan sekitar 80% peristiwa infeksi dikaitkan melalui pembentukan biofilm (Archer *et al.*, 2011).

Beberapa bakteri resisten terhadap antibiotik tertentu, sehingga diperlukan solusi lain dengan menggunakan zat antimikroba dari tumbuhan (Sari *et al.*, 2020). Pemanfaatan material alami bisa dijadikan alternatif pengobatan untuk mengatasi masalah resistensi bakteri disebabkan adanya biofilm yang menimbulkan infeksi, bahan alam memiliki toksisitas rendah, mudah didapatkan serta biayanya murah. Sebuah tanaman yang dapat digunakan dalam penelitian antibakteri dan biofilm ialah daun gamal (*Gliricidia sepium* (Jacq Walp)). Penelitian sebelumnya bahwa daun gamal terdapat kandungan flavonoid, alkaloid, steroid, tanin, serta terpenoid yang mempunyai aktivitas antibakteri (Akharaiyi *et al.*, 2012).

Daun gamal dianggap mempunyai efek antibakteri dikarenakan mengandung senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antimikroba. Hasil penelitian sebelumnya tentang aktivitas antibakteri ekstrak daun gamal dengan metode difusi menunjukkan daya hambat sebesar 15 mm dan 14,5 mm Luh *et al.*, (2018). Penelitian Kamal, (2020) bahwa ekstrak daun gamal menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Membran sel mikroba rusak karena kemampuan flavonoid lipofilik untuk menghancurkan protein ekstraseluler yang terlarut pada dinding sel..

Rusaknya membran sel cenderung menjadi penyebab keluarnya metabolit penting pada sel, karenanya sel bisa mati (Dermawan, 2021). JH *et al.*, (2013) menyebutkan flavonoid serta tanin memiliki potensi dalam menekan pertumbuhan biofilm diakrenakan mampu menekan *intercellular adhesion genes icaA* dan *icaD*. Kerusakan membran sel ditentukan jumlah ion Ca^{2+} pada plasma sel serta bahan yang sel lepaskan mampu diserap dalam panjang gelombang tertentu (Bunduki *et al.*, 1995). Kerusakan membran sel bakteri dapat dilakukan pengamatan menggunakan ASS dan SEM.

Penelitian ini bertujuan mencari tahu fraksi teraktif yang menunjukkan sifat antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, serta mengetahui sifat antibakteri dan antibiofilm ekstrak serta etil asetat, fraksi n-heksana, serta air daun gamal terhadap *S. aureus*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini berjenis eksperimental melalui ekstraksi daun gamal kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi, dari fraksi n-heksan, air, serta etil asetat yang diperoleh kemudian aktivitas antibakteri dan antibiofilmnya diuji terhadap bakteri *S. aureus* kemudian dilanjutkan dengan uji SEM fraksi teraktif dari ekstrak daun gamal.

Alat

Alat ekstraksi serta fraksinasi yang peneliti gunakan ialah bejana kaca, gelas ukur, corong pisah, rotary evaporatory, freeze dryer, pengaduk kaca dan wadah kaca. Untuk pengujian mikrobiologi adalah tabung reaksi, botol coklat, cawan petri, erlenmayer, corong kaca, corong pisah, water bath, pipet tetes, pipet volume, inkubator, pinset, bunsen, inkubator (Memmert®), lampu UV, gelas (Pyrex®), microplate flat bottom 96 wells (Iwaki), yellow tip, mikropipet (Socorex), ose, serta blu tip.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun berupa simplisia kering yang dibuat menjadi serbuk Bahan yang peneliti gunakan yakni ekstraksi etanol 96%. Lempeng Selika Gel F254 untuk megedintifikasi kandungan kimia pada daun gamal. Bakteri *S. aureus* yang didapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta, daun gamal, etanol 96%, Mannitol Salt Agar (MSA), Brain heart infusion (BHI), Vogel Jhonson Agar (VJA), NaCl 0,9%, DMSO 5%, akuades, safranin, lugol, iodin, Natrium Broth (NB), kristal violet 1%.

Ekstraksi

Serbuk daun gamal dilakukan pengambilan sejumlah 1000 gram dilakukan perendaman menggunakan pelarut etanol 96% (1:10) pada wadah kaca ditutup aluminium foil dilaksanakan maserasi dalam 24 jam dengan temperatur ruang dengan sesekali diaduk di 6 jam pertama. Pisahkan maserat melalui penyaringan dengan kertas whatman, penyaringannya diulang minimal sekali menggunakan pelarut yang sama serta jumlah volume pelarut yang digunakan setengah kali jumlah volume pelarut dalam penyarian pertama. Ekstraknya kemudian dilakukan pemekatan dengan bantuan Vacuum Rotary Evaporator di temperatur 55°C hingga didapat ekstrak kental serta dilakukan penghitungan pada rendemen yang didapat.

Fraksinasi

Sebanyak 20 gram ekstrak etanol 96% dijadikan homogen menggunakan aquadest 50 mL. kemudian masukkan larutan ekstrak menuju corong pisah, serta ditambahkan 50 mL n-heksan.

Dilakukan pengocokan sampai homogen kemudian dilakukan pendiaman hingga terbentuklah 2 lapisan. Sesudah terbentuknya 2 lapisan fasa *n*-heksan, keluarkan air dengan penampung yang berbeda. Simpan fasa *n*-heksan serta air ke corong pisah serta tambahkan 50 mL *n*-heksan. Proses tersebut dilakukan pengulangan sampai fasa *n*-heksan terlihat tanpa warna ataupun jernih. Lakukan penggabungan serta penguapan Fasa *n*-heksan samapi didapat fraksi ekstrak kental. Lanjutkan fraksinasi melalui penuangan fasa air menuju corong pisah selanjutnya lakukan penambahan etil asetat dengan volume 50 mL, dilakukan pengocokan sampai homogen keluarkan setiap fasanya untuk dilakukan penampungan pada wadah yang lain. Hal tersebut diulang sampai didapat fasa etil asetat dengan sifat tanpa warna serta jernih. Kemudian lakukan penguapan Fasa etil asetat serta air sampai memperoleh ekstrak kental.

Identifikasi Kandungan Senyawa Ekstrak Dan Fraksi Daun Gamal

Pengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun gamal dengan tujuan mengetahui kandungan senyawa kimia pada tanaman gamal misalnya flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, serta terpenoid (Harborne, 1987).

1. Flavonoid

Identifikasi pereaksi warna 2 ml ekstrak dan fraksi daun gamal diambil dan dicampur dengan methanol Kemudian ditambahkan 5 tetes HCl pekat serta 2 ml gram serbuk Mg. Adanya flavonoid pada ekstrak dan fraksi daun gamal menunjukkan endapan berwarna jingga dalam hasil (Agusti *et al.*, 2016).

2. Saponin

Identifikasi pereaksi warna ekstrak dan fraksi ekstrak daun gamal diambil sebanyak 2 ml ditambahkan 10 mL air panas pada tabung reaksi, selanjutnya kocok secara kuat dalam waktu 10 detik. Bila ada buih dengan sifat yang stabil maka menjadi indikasi terdapat saponin (Putri *et al.*, 2022).

3. Alkaloid

Identifikasi pereaksi warna ekstrak dan fraksi ditimbang 2 ml ditambahkan 5 ml HCl 2N Larutan dengan cara mendapatkannya melalui pembagian dijadikan 3 bagian, Tabung pertama dipergunakan menjadi blanko, tabung kedua ditambah pereaksi Dragendroff sejumlah 3 tetes serta tabung ketiga ditambah pereaksi Mayer sejumlah 3 tetes. Hasil positif ekstrak dan fraksi mengandung alkaloid ditunjukkan dengan pembentukan endapan jingga dalam tabung kedua

serta endapan putih sampai kekuningan dalam tabung ketiganya (Farnsworth, 1966).

4. Tanin

Identifikasi pereaksi warna ekstrak dan fraksi daun gamal diambil sebanyak 2 ml ditambah 5cc aquadest selanjutnya dilakukan pendidihan dalam waktu a 5 menit Larutan tersebut difiltrasi serta tambahkan 5 tetes tetes FeCl 1 % pada filtratnya. Uji tanin memperlihatkan hasil positif bila terbentuk warna hitam ataupun biru tua (Farnsworth, 1966)

5. Terpenoid

Identifikasi pereaksi warna ekstrak dan fraksi daun gamal masing-masing dilakukan pengambilan sejumlah 2 mL, dilakukan penguapan pada cawan penguap Residu dilakukan pelarutan menggunakan 0,5 ml kloroform selanjutnya pinahkan menuju tabung reaksi serta tambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat serta 2 ml asam sulfat pekat lewat dinding tabung. Pembentukan cincin kecoklatan ataupun violet dalam perbatasan larutan memperlihatkan di dalamnya terdapat triterpenoid (Fransworth, 1966).

Persiapan Sampel Uji dan Identifikasi Bakteri

Pengujian menggunakan fraksi etil asetat, *n*-heksana, dan air digunakan dalam konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6, 25%, 0,3125%, 1,4%, 0,8%, 0,4%, 0,2%, dan 0,1%. Setelah sampel ditimbang, masing-masing sampel dilarutkan dalam DMSO 5% hingga 5ml serta dilakukan pengambilan berdasarkan volume yang diperlukan dalam pengujiannya. Untuk membuat larutan kontrol positif, tetrasiklin dilarutkan menggunakan aquadest steril. Untuk memastikan bakteri *S. aureus* benar, digunakanlah metode identifikasi makroskopis, mikroskopis, dan biokimia.

Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Dilusi

Penetapan KHM dilaksanakan melalui metode dilusi cair *broth dilution test (Serial dilution)*. Media ujinya yakni *Brain Heart Infusion (BHI)*. Metode tersebut mempergunakan 1 deretan tabung reaksi dengan meliputi 12 tabung steril yang berisi fraksi aktif daun gamal dengan konsentrasi. Pengujian KHM dilakukan dengan membuat konsentrasi fraksi daun gamal yaitu 50%; 25%; 12,5% 6,25%; 0,3125%; 1,4%; 0,8%; 0,4%; 0,2% dan 0,1%. Tabung 1 serta 2 dijadikan kontrol positif serta negatif. Tabung 3 hingga 12 berisikan konsentrasi 0,5 ml menggunakan pengenceran bertingkat selanjutnya tambahkan suspensi bakteri sejumlah 0,5 ml dengan cara aseptik fraksi-fraksi daun gamal.

Tabung 12 dijadikan kontrol positif dengan berisikan suspensi bakteri saja, kemudian dilakukan

inkubasi di temperatur 37°C dalam waktu 24 jam. Konsentrasi paling kecil untuk tabung yang jernih dengan tidak disertai pertumbuhan bakteri uji dinilai menjadi KHM. Nilai KHM ialah konsentrasi paling rendah fraksi teraktif daun gamal yang masih dapat menghambat bakteri uji (Sari, 2017). Konsentrasi Bunuh Minimum KBM) ditetapkan melalui penginokulasian tabung media yang jernih dengan menggoreskannya dalam media selektif untuk dilakukan inkubasi dalam suhu 37 °C dalam waktu 24-48 jam. Dilihat apakah terdapat koloni yang bertumbuh dalam permukaan media lempengnya.

Pengamatan Morfologi Membran Sel Bakteri

Pada penelitian ini, karakter pada permukaan struktur biomaterial serta perubahan morfologi bakteri diamati melalui teknik *Scanning Electron Microscopy* (SEM). Hasil KBM dan kontrol dilakukan inkubasi selama 24 jam serta dilakukan pengocokan di temperatur 22-25°C. Hasilnya disentrifugasi, selanjutnya biomassa sel dimasukkan menuju larutan prefiksatif (2,5% glutaraldehid pada *phosphat bufer* serta *cocodylate buffer*), dalam waktu 2 jam. Hasilnya dilakukan sentrifugasi serta endapannya selanjutnya dilakukan pencucian ulang menggunakan larutan *buffer fosfat* serta tambahkan pula *tannic acid* 2% sebagai pemfiksasi.

Hasil disentrifugasi serta endapannya selanjutnya dilakukan pencucian ulang menggunakan larutan *cocodylate buffer*, *buffer fosfat* serta divortex, didiamkan 10 menit serta tahapan tersebut dilakukan pengulangan 2 kali. Kemudian selnya dilakukan sentrifugasi ulang serta dilakukan pengambilan biomassa sel, dilakukan penambahan osmium tetra oksida 1%, divortex dilakukan pendiaman dalam waktu 1 jam di temperatur yang dingin. Sel didehidrasi melalui penambahan etanol (50%, 70%, 80%, 95%, serta etanol absolut) yang selanjutnya dilakukan suspensi pada t-butanol serta dilakukan pengeringan menggunakan *freeze drying*.

Sampel selanjutnya ditempatkan dalam *carbon tip* yang telah ditempel dalam stub. Selnya kemudian diberi lapisan logam emas dalam waktu 10 detik melalui ion sputter dan dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop analisis pemindaian elektron SEM JEOL JSM 5310 LV (Saptarini O, 2021).

Analisis Kebocoran Membran Sel Bakteri Dengan Metode AAS

Analisis kebocoran sel pada penelitian ini menggunakan metode AAS. Analisis kebocoran ion dilaksanakan dalam tabung dengan dinyatakan menggunakan 1 kali KBM dalam metode dilusi.

Kebocoran ion-ion Ca^{2+} dilakukan pendeteksian melalui AAS. Hasil 1 kali KBM selanjutnya dilakukan pengambilan sejumlah 1 ml serta kemudian dilakukan pengenceran dalam labu takar 100 ml. Hasilnya dilakukan pengukuran menggunakan AAS melalui destruksi basah dengan HNO_3 (Park, 1996). Kebocoran diukur melalui pengamatan ion-ion logam pada bakteri uji sesudah terjadinya kontak dengan fraksi aktif dalam konsentrasi 0 (kontrol), 1 serta 2. Cairan supernatan dilakukan analisis melalui AAS *Thermo Elemental* tipe. Solar MS larutan sel hasil kontak dengan fraksi dilakukan pengambilan supaya diketahui ukuran kandungan berbagai ion di dalamnya (Cox *et al*, 2000).

Optimasi Waktu Pembentukan Biofilm

Tujuan optimasi adalah dapat memaksimalkan waktu inkubasi untuk membentuk biofilm. Waktu inkubasinya ialah 1 hari, 2 hari, 3 hari, hingga tiga hari. Suspensi bakteri disetarakan dengan Mc Farland 0,5 dilakukan pengambilan dengan jumlah 200 μ L dimasukkan menuju masing-masing *wells* selanjutnya dilakukan inkubasi di temperatur 37°C. Pengamatan saat inkubasi dilaksanakan di hari ke 1, 2 serta 3. Sesudah diinkubasi, dilakukan pencucian *microplate* dengan air steril sejumlah 3 kali selanjutnya masukkan 200 μ L larutan kristal violet 1% menuju masing-masing sumuran serta dilakukan inkubasi di suhu ruang dalam waktu 15 menit. Cuci *Microplate* dengan air steril sejumlah 3 kali serta dikeringkan di suhu ruangan.

Saat *microplate* kering, masukkan 200 μ L etanol 96% menuju masing-masing sumuran serta dilakukan inkubasi di suhu ruangan dalam waktu 15 menit. Kemudian dilaksanakan pembacaan OD (*Optical Density*) dengan peralatan *iMark-Biorad Microplate Reader* dengan panjang gelombangnya di Absorbansi 595 nm. Pengujian dikerjakan secara aseptis. Optimalnya, panjang gelombang serta waktu inkubasi akan dimanfaatkan pada saat pengujian aktivitas penghambatan serta degradasi biofilm.

Uji Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm

Pengujian dalam penghambatan pembentukan biofilm dilaksanakan dengan *microplate polystyrene 96 wells* bermedia BHI. Tujuannya adalah untuk mengetahui apakah daun gamal memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *S. aureus* selama proses pertumbuhan biofilm. Setelah sampel diinkubasi, setiap sumuran mengandung 70 μ l sampel dengan seri konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5 % (b/v) dalam media. Selanjutnya, 70 μ l suspensi bakteri pada media yang setara dengan

1,5x10⁸ CFU/mL ditambah ke sumuran yang mengandung sampel.

Sumurnya dilakukan inkubasi dalam waktu 72 jam di temperatur ± 37°C. Sesudahnya dilakukan pengeringan pada mikroplate dalam waktu 15 menit dengan mengembalikannya ke suhu ruang. Setiap sumuran diisi dengan 200 µl larutan kristal violet 1%, dan pewarnaan dilakukan dalam waktu 15 menit. Selanjutnya, sumurannya dilakukan pembilasan menggunakan air mengalir. Sesudahnya, mikroplate dikeringkan kembali dalam temperatur ruangan dalam waktu satu jam.

Larutan etanol 96% selanjutnya ditambahkan ke tiap sumuran pada plat sebanyak 200 µL. uji dilakukan dengan densitas optik 595 nm dilakukan tiga kali (Kirmusaoglu, 2019). Kontrol uji (bakteri+media+fraksi-fraksi) merupakan kontrol uji aktivitas daun gamal dalam menghambat pertumbuhan biofilm Kontrol positif menggunakan Tetrasiklin.

% Penghambatan Biofilm :

$$\frac{OD \text{ Negatif} - OD \text{ Sampel}}{OD \text{ Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

Uji Degradasi Biofilm

Uji ini dilakukan sama seperti uji penghambatan biofilm, tetapi untuk uji aktivitas degradasi biofilm, masing-masing fraksi ditambahkan saat biofilm mulai terbentuk. Uji aktivitas degradasi biofilm dilaksanakan dengan *microplate round bottom polystyrene 96 wells* bermedia BHI. Setelah 70 µL media ditambahkan di masing-masing sumuran, 70 µL suspensi bakteri pada BHI ditambahkan, yang setara dengan 1,5x10⁸ CFU/mL. Ini menghasilkan biofilm. Selanjutnya mikroplate disimpan selama 72 jam pada suhu ± 37°C. Setelah itu, isi sumuran dikeluarkan, dan air mengalir digunakan untuk membersihkannya. Seri konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% (b/v) diterapkan pada media 200 µL untuk setiap sampel. Selanjutnya, plat mikroplate dilakukan inkubasi dalam waktu 24 jam dalam temperatur ±37°C.

Biofilm dapat diidentifikasi menggunakan teknik yang sama yang digunakan untuk menguji kinerja penghambatan pembentukan biofilm (Kirmusaoglu, 2019). Kontrol dalam uji ini ialah kontrol negatif (bakteri + media) merupakan kontrol pembentukan biofilm yang mana pertumbuhan bakteri tidak diganggu, kontrol sampel (bakteri+media+fraksi) merupakan kontrol uji aktivitas daun gamal dalam mendegradasi biofilm.

% Penghancuran Biofilm :

$$\frac{OD \text{ Negatif} - OD \text{ Sampel}}{OD \text{ Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

Analisis Data Statistik

Dianalisis data secara statistik uji normalitas oleh *Shapiro Tes Wilk*, bila datanya memiliki distribusi normal ($p > 0,05$). Uji statistik analisis varians satu arah dilakukan dengan tingkat signifikan ($p < 0,05$), uji ini akan diikuti oleh *Post Hoc Tukey* dengan tingkat signifikan $p < 0,05$. Uji statistik yang digunakan SPSS versi 26.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peneliti mempergunakan serbuk daun gamal sebanyak 1000 g dalam rangka mendapatkan ekstrak sebanyak 317 g dan dengan demikian didapat persen rendemen 31,7%. Penelitian Ulfa *et al.*, (2016) melaporkan daun gamal yang dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etanol memiliki rendemen ekstrak sejumlah 24,7%. Penelitian Dina *et al.*, (2023) menggunakan pelarut etil asetat menghasilkan rendemen ekstrak daun gamal 18,708 gram dengan rendemen 3,74%. Hasil ini tak sama dengan pelarut etanol 96% yang memperoleh hasil rendemen ekstrak 31,7%.

Menurut sejumlah penelitian, konsentrasi pelarut beserta lama tahap maserasi berhubungan satu sama lain (Satria *et al.*, (2020). Semakin lama proses maserasi, semakin banyak ekstrak yang dihasilkan. Seberapa efektif proses ekstraksi dilakukan memengaruhi kecil besarnya perolehan hasil rendemen. Menurut Febrina *et al.*, (2015) suhu, waktu, pelarut, pengadukan, ukuran sampel, serta interaksi yang kuat dengan pelarut adalah beberapa faktor yang memengaruhi hasil ekstraksi. Luas permukaan sampel juga memengaruhi jumlah rendemen karena kontak yang lebih luas dan interaksi yang lebih kuat dengan pelarutnya (Sineke *et al.*, 2016).

Sebanyak 20 gram ekstrak kental daun gamal difraksisasi, menghasilkan 5 gram fraksi etil asetat, 3 gram fraksi n-heksana, serta 7 gram fraksi air. Akibatnya, persentase rendemen daun gamal tidak genap 100%. Sebagian besar senyawa dalam daun gamal memiliki sifat yang polar. Maka darinya, fraksi air yang didapat mempunyai jumlah terbesar dibandingkan dengan semua fraksi yang lain.

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun gamal: fraksi n-heksana terdapat kandungan alkaloid serta flavonoid; fraksi etil asetat terdapat kandungan alkaloid, flavonoid, serta tanin; dan fraksi air terdapat kandungan alkaloid, tanin, serta terpenoid (Tabel 1).

Hasil identifikasi makroskopis menunjukkan bahwa bakteri *S. aureus* membentuk koloni kuning pada media MSA dan membuat

media menjadi kuning (Gambar 1). Perubahan ini disebabkan oleh fermentasi manitol, yang mengubah warna phenol merah menjadi kuning (Dewi, 2013). Bakteri *Staphylococcus* dapat mengurai

gula pada larutan manitol, menyebabkan peningkatan kadar asam serta media berwarna kuning (Hayati *et al.*, 2019).

Tabel 1. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi daun gamal

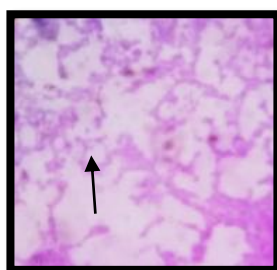
No.	Metabolit Skunder	Ekstrak	Fraksi <i>n</i> -heksan	Fraksi etil asetat	Fraksi air
1	Flavonoid	+	+	+	-
2	Saponin	+	-	-	-
3	Alkaloid	+	+	+	+
4	Tanin	+	-	+	+
5	Terpenoid	+	-	-	+



Gambar 1. Hasil Identifikasi Mikroskopis *Staphylococcus aureus* Pada Media MSA

Marfologi memastikan bahwa bakteri *S. aureus* yang digunakan adalah yang asli dan tidak terkontaminasi oleh bakteri lain. Pewarnaan gram perbesaran kuat (100x) digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan warna ungu (Gambar 2), memiliki bentuk bulat, serta bergerombol serupa dengan buah anggur. Larutan lugol dan kristal violet diterapkan pada lapisan

peptidoglikan untuk membuat pori peptidoglik. Sebagai bagian dari proses identifikasi, pewarnaan gram digunakan untuk mengidentifikasi kompleks kristal violet. Dengan demikian, lugol dan kompleks kristal violet tidak terlepas, dinding sel tetap berwarna ungu, dan warna bakteri tidak diubah oleh penambahan safranin (Rachma *et al.*, 2009).



Gambar 2. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Staphylococcus aureus* Perbesaran (100x)

Uji biokimia dilakukan untuk menemukan biakan bakteri murni berdasarkan sifat fisiologinya. Metabolisme sel adalah bagian penting dari proses biokimia karena mencakup reaksi kimia yang terjadi oleh sel, yang baik menghasilkan energi dan mempergunakan energinya untuk membentuk bagian dan melakukan kegiatan lain seperti ada pergerakan (Pelczar *et al.*, 2010). Identifikasi biokimia pada bakteri *S. aureus* ialah uji koagulase serta katalase

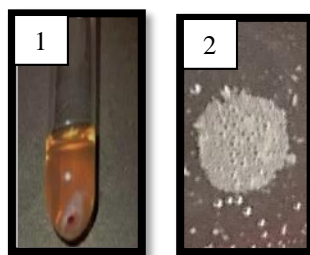
Pengujian koagulase *S. aureus* menunjukkan reaksi positif (Gambar 3), yang berarti ada penggumpalan dalam plasma darah kelinci yang terkena bakteri. Hasil identifikasi ini

membuktikan keberadaan bakteri *Staphylococcus aureus*. Kriteria yang paling umum digunakan untuk mengidentifikasi *S. aureus* secara sementara adalah produksi koagulase, yang menunjukkan kapasitas bakteri untuk menghasilkan enzim yang dikenal sebagai koagulase (Abrar, 2001). Koagulase, protein ekstraseluler yang mampu menggumpalkan plasma menggunakan bantuan faktor pada serum, sebagai pembeda *S. aureus* dari jenis *staphylococcus* yang lain (Brückler *et al.*, 1994).

Hasil pengujian aktivitas antibakteri (Tabel 2) dilakukan dengan teknik dilusi ataupun pengujian seri pengenceran. Metode tersebut berguna dalam rangka mencari tahu dosis minimal dari obat dengan

sifat yang bakterisid serta bakteriostatik. Uji Kadar Kadar Hambat Minimum (KHM) etil asetat, fraksi n-heksan, serta air menggunakan metode dilusi cair

terhadap bakteri *S. aureus* yang berkonsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,4%; 0,8%; 0,4%; 0,2 dan 0,1%.



Gambar 3. Hasil (1) Koagulase dan (2) Katalase bakteri *Staphylococcus aureus*

Tabel 2. Hasil Uji KHM Fraksi-Fraksi Daun Gamal

No.	Konsentrasi (%)	Fraksi n-heksana			Fraksi etil asetat			Fraksi air		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	50 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	25 %	+	+	+	-	-	-	+	+	+
3	12,5 %	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4	6,25 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	3,125 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	1,4 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	0,8 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	0,4 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	0,2 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	0,1 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	Tetrasiklin (+)	-	-	-						
12	Kontrol media (BHI)	+	+	+						

Keterangan: (R1) Replikasi 1; (R2) Replikasi 2; (R3) Replikasi 3; (-) Tidak Ada Pertumbuhan Bakteri (+) Ada Pertumbuhan Bakteri

Hasil KHM diamati dengan melihat kekeruhan pada tabung. Kekeruhan pada tabung dikarenakan adanya pertumbuhan bakteri uji. Hasil pengamatan menunjukkan keruh pada konsentrasi 0,1%; 0,2%; 0,4%; 0,8%; 1,4%, 3,125%; 6,25%;, pengujian dilanjutkan dengan menginokulasikan pada konsentrasi 1,4% - 50% hasil dilusi pada medium VJA. Berdasarkan data pada tabel 13 dapat terlihat bahwa KHM fraksi etil asetat daun gamal ada di konsentrasi 6,25%. Hasil inokulasi dengan metode gores digunakan untuk menetapkan KBM.

Hasil uji KBM dengan metode gores di media padat fraksi n-heksan pada konsentrasi 6,25% - 50% masih ada pertumbuhan bakteri. Pada hasil KBM fraksi etil asetat dari konsentrasi 12,5%-50% tidak ada pertumbuhan bakteri, sedangkan pada hasil KBM uji fraksi air hanya konsentrasi 50% tidak ada pertumbuhan bakteri. Kontrol negatif pada penelitian ini adalah bakteri pada media BHI. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui adanya bakteri yang tumbuh dalam media yang digunakan.

Tabel 3. Hasil Uji KBM Fraksi-Fraksi Daun Gamal

No.	Konsentrasi (%)	Fraksi n-heksana			Fraksi etil asetat			Fraksi air		
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
1	50 %	+	+	+	-	-	-	-	-	-
2	25 %	+	+	+	-	-	-	+	+	+
3	12,5 %	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4	6,25 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	1,4%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Tetrasiklin (+)	-	-	-						
7	Kontrol media (BHI)	+	+	+						

Keterangan: (-) Tidak Ada Pertumbuhan Bakteri; (+) Ada Pertumbuhan Bakteri

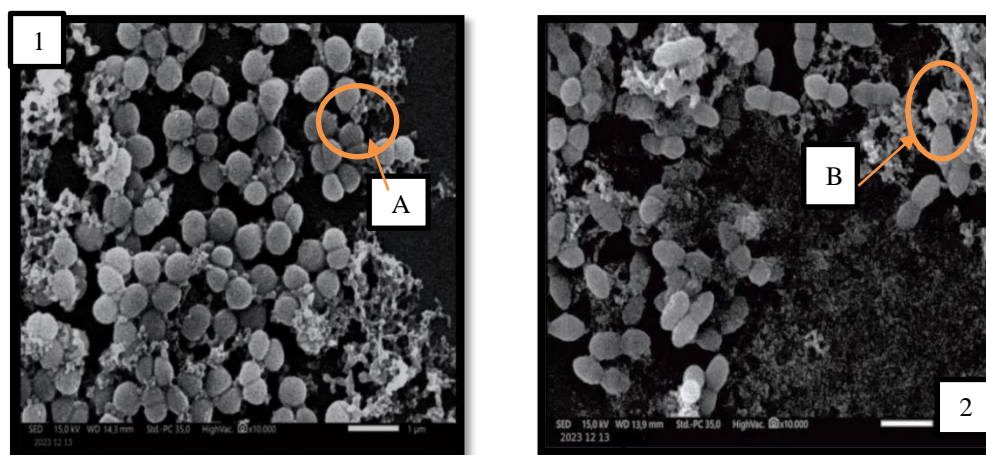
Kontrol positif pada uji antibakteri adalah antibiotik tetrasiklin. Tetrasiklin digunakan sebagai pembanding pada pengujian aktivitas antibakteri karena mekanisme kerja dengan mencegah sintesis protein di ribosom bakteri. Difusi pasif dan transportasi aktif adalah dua cara tetrasiklin masuk ke dalam bakteri. Setelah masuk ke ribosom, ia berikatan dengan ribosom selama 30s dan mencegah kompleks t-RNA-asam amino masuk ke asam amino sehingga proses sintesis protein tidak dapat berlangsung, yang berarti bakteri tidak dapat bermetabolisme (Tariq *et al.*, 2018).

Berdasarkan hasil penelitiannya, fraksi etil asetat yang teraktif cenderung mempunyai aktivitas Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Perihal tersebut dikarenakan dalam fraksi etil asetat daun gamal terkandung zat flavonoid, alkaloid, serta tanin. Senyawa flavonoid mempunyai aktivitas antibakteri melalui pemberian efek bakteriolitik, melakukan penghambatan terhadap sintesis DNA, protein, RNA, serta memicu rusaknya permeabilitas membran sel (Dzoyem *et al.*, 2013).

Berdasarkan Wu *et al.*, (2013) flavonoid mempunyai aktivitas antibakteri dikarenakan mampu berinteraksi dengan membran sel serta berpengaruh pada bioaktivitas membran sel serta flavonoid juga dapat menekan fluiditas membran sel bakteri yang berkaitan dengan kerusakan membran sitoplasma secara langsung ataupun kerusakan tak langsung lewat autolisis ataupun pelemahan dinding sel serta berakibat pada lisis osmotik.

Tannin adalah polifenol yang memiliki kemampuan untuk mengendapkan protein dilaporkan bahwa tannin dapat menghentikan pertumbuhan mikroorganisme melalui pengendapan protein mikroba serta memicu tak bisa diaksesnya protein nutrisi oleh bakteri (Prasad *et al.*, 2008). Senyawa alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme kerja terkait gangguan komponen yang bertugas menyusun peptidoglikan dalam dinding sel bakteri serta menjadi akselerator pada enzim topoisomerase terkait penghambatan DNA sel bakteri (Wu *et al.*, 2013 dalam simanjuntak 2020). Alkaloid mampu menjadi penghambat pembentukan protein, respirasi sel, serta merusak komponen yang menyusun peptidoglikan dan dengan demikian komponennya tak bisa secara sempurna terbentuk (Balsundram *al.*, 2006).

Hasil pengamatan perubahan morfologi bakteri *S. aureus* ATCC 25923 menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) yang telah diberi perlakuan fraksi etil asetat daun gamal adalah adanya perubahan bentuk sel bakteri (Gambar 4). Sel bakteri dengan perlakuan mengalami perubahan bentuk pada membran sel dibandingkan dengan bakteri tanpa perlakuan, pada gambar 1 menunjukkan morfologi bakteri *S. aureus* dengan membran sel yang utuh, sementara gambar 2 menunjukkan bakteri yang mengalami lisis karena ketidakstabilan membran sel yang mengganggu metabolisme bakteri.



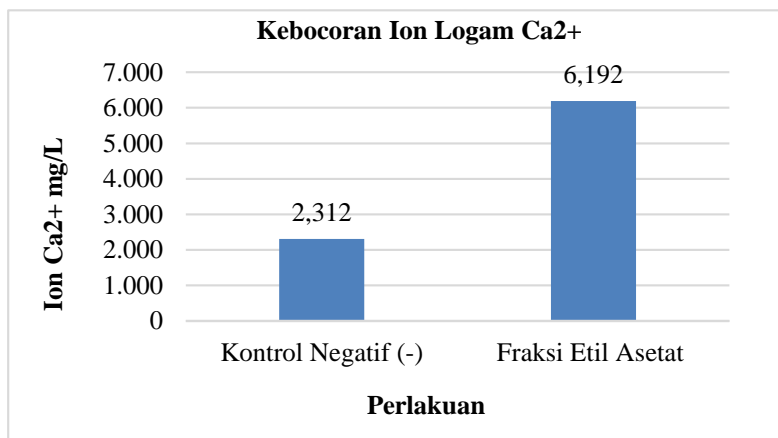
Gambar 4. Marfologi bakteri *S aureus* ATCC 25923 dengan pengamatan SEM (10.000) (1) tanpa perlakuan, (2) setelah perlakuan fraksi etil asetat. Tanda panah pada 1A menunjukkan permukaan membran sel bakteri masih utuh, sedangkan tanda panah pada 2B menunjukkan membran sel bakteri mengkerut dan mengalami perubahan bentuk semulanya.

Pemberian fraksi etil asetat kerusakan dalam membran sel bisa diobservasi dengan cara mikroskopis melalui SEM, dengan tanda-tanda permukaan sel yang mengerut. Senyawa aktif pada daun gamal tunggal memiliki sifat amfifatik, yang

memungkinkan melewati membran luar sel yang lipopolisakarida (LPS) selimuti memiliki sifat amfifatik. Tannin dapat mengkerutkan membran sel bakteri menghentikan bakteri untuk berfungsi dan menghentikan pertumbuhannya (Tula *et al.*, 2012).

Setelah membran bakteri rusak, senyawa flavonoid mampu memasuki bagian seluler bakteri serta memicu rusaknya inti bakteri. Selain itu, peningkatan permeabilitas membran menyebabkan komponen penyimpanan hilang yang mengakibatkan bentuk sel menipis atau area permukaan sel yang kosong.

Pengamatan kebocoran ion logam Ca^{2+} bakteri *S. aureus* dengan penambahan fraksi etil asetat dapat menyebabkan peningkatan kebocoran ion. Ion Ca^{2+} berfungsi menghubungkan lipopolisakrida pada dinding sel bakteri gram positif sebagaimana terdapat pada Gambar 5 berikut.



Gambar 5. Grafik Kebocoran Ion Ca^{2+}

Park *et al.*, (2003) menyebutkan komponen isi sel yang mengalami kebocoran bisa dilakukan pengukuran di panjang gelombang 260 nm ialah DNA diantaranya ialah pirimidin, ribonukleotida, purin, dan untuk panjang gelombang 280 nm mampu dibuat dalam melakukan pengukuran triptopan serta tirosin. Penelitian yang dilakukan oleh (Ezzudin & Rabeta (2018) flavonoid memiliki kemampuan untuk mempengaruhi dinding sel bakteri, ini terjadi karena ion Ca^{2+} merupakan komponen dinding sel dan menghalangi permeabilitas membran sel.

Sitoplisma yang mengandung DNA, protein, kalsium bocor menyebabkan kerusakan membran sel dari penyebab kematian bakteri (Budiman & Aulifa, 2020). Hasil penelitian menunjukkan bahwa

peningkatan kadar ion logam Ca^{2+} di luar sel menunjukkan kerusakan permeabilitas membran sel bakteri (Syarifuddin & Sulistyani, 2018). Adanya mekanisme kerja senyawa tanin adalah dengan menghancurkan dinding polipeptida sel bakteri. Rusaknya membran polipeptida sel bakteri menyebabkan pembentukan membran sel bakteri tidak sempurna serta bakteri akan mati (Dwiningsih, 2016). Perihal ini karena dinding sel senantiasa utuh namun isi selnya keluar karena membran selnya rusak.

Menggunakan alat Elisa yang berpanjang gelombang 595 nm, dilakukan maksimalisasi waktu pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*, yang mencapai 72 jam (Tabel 4).

Tabel 4. Hasil Waktu Optimasi Pembentukan Biofilm *S. aureus*

No.	Absorbansi		
	24 jam	48 jam	72 jam
1	0,138	0,223	0,397
2	0,155	0,241	0,389
3	0,186	0,271	0,395
4	0,167	0,267	0,412
5	0,166	0,283	0,395
6	0,197	0,261	0,392
7	0,186	0,192	0,396
8	0,112	0,204	0,389
9	0,141	0,285	0,399
10	0,128	0,212	0,392
Rata-rata	0,158 ± 0,028	0,234 ± 0,032	0,396 ± 0,007

Waktu inkubasi 72 jam, *S. aureus* mampu membentuk biofilm terbaik serta paling efektif, seperti yang ditunjukkan oleh hasil pada tabel tersebut. Pambayun *et al.*, (2008) menyebutkan pertumbuhan bakteri *S. aureus* meliputi sejumlah fase yang diantaranya lag, log, stasioner, serta kematian. Fase stasioner timbul sewaktu pertumbuhannya ada di angka 120 jam, serta fase kematian muncul sesudah 20 jam.

Hasil optimasi waktu terkait terbentuknya biofilm bisa diamati di tabel 4. Merujuk kepada penelitian Tobi *et al.*, (2022) panjang gelombang saat membaca biofilmnya ialah 595 nm. Panjang gelombang tersebut adalah panjang gelombang paling optimal terkait pembacaan biofilm ialah 595 nm, diperlihatkan melalui nilai absorbansi (OD) terbesar dari tiga variasi panjang gelombang yang lain yakni 595 nm, 490 nm, dan juga 655 nm. Panjang gelombang tersebut dipergunakan pada pembacaan biofilm bakteri uji dalam microplate reader.

Hasil optimasi waktu dalam terbentuknya biofilm bakteri *S. aureus* bernilai absorbansi rata-rata dalam inkubasi 24 jam yakni $0,158 \pm 0,028$; dalam inkubasi 48 jam yakni $0,254 \pm 0,032$; dalam inkubasi 72 jam yakni $0,396 \pm 0,007$. Hasil nilai absorbansi paling besar bisa dilihat saat inkubasi hari ketiga. Nampak pula *S. aureus* mempunyai waktu pertumbuhan optimal saat hari ke-3 yang bernilai rerata OD $0,396 \pm 0,007$. Waktu ini merupakan waktu paling optimal dalam pertumbuhan biofilm yang selanjutnya dimanfaatkan menjadi rujukan masa inkubasi saat menguji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm serta degradasi biofilm di setiap sample bakteri *S. aureus*.

Terbentuknya biofilm diawali sewaktu bakteri menempel pada kondisi permukaan lewat

molekul organik. Tingkatan lekatan sel mikroba mendapatkan pengaruh dari beberapa faktor diantaranya kondisi permukaan, sifat permukaan, hidrodinamika, serta karakteristik media cair, beragam karakteristik permukaan sel mikroba, kuorum sensing, serta regulasi gen (Mahami & Gyamfi, 2011).

Biofilm mampu membentuk di berbagai jenis permukaan serta keadaan lingkungan bakteri kondisi film dipengaruhi berdasarkan adanya bakteri, molekul anorganik serta organik permukaan. Substrat anorganik serta organik menuju permukaan bersamaan mikroorganisme lewat metode difusi ataupun melalui aliran cairan. Biofilm memiliki transfer nutrisi yang lebih baik dibandingkan fase cair (Riemann & Cliver, 2006). Keadaan media cair, misalnya nutrisi, pH, suhu, serta kekuatan ion juga kemungkinan memengaruhi tingkat perlekatan mikroba. Polimer organik media yang terendam pada permukaan memengaruhi kekuatan serta tingkatan perlekatan mikroba. Film terbentuk pada beberapa menit pemaparan serta senantiasa mengalami perkembangan di beberapa jam ke depan.

Pengujian aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dilaksanakan dengan memasukkan ekstrak dan fraksi daun gamal ke dalam mikroplate dengan konsentrasi yang berbeda. Kemudian, media dan suspensi bakteri ditambahkan ke dalam tiap sumuran (*wells*) yang kemudian diinkubasi. Mikroplate yang telah diinkubasi kemudian diwarnai dengan larutan kristal violet. Kristal violet dibersihkan dengan air mengalir. Kristal violet akan menempel pada biofilm membuat cincin berwarna ungu pada mikroplate.

Tabel 5. Hasil Persentase Rata-Rata Penghambatan Pembentukan Biofilm Ekstrak Dan Fraksi Daun Gamal

No.	Konsentrasi (%)	Ekstrak (%)	Fraksi n-heksan (%)	Fraksi etil asetat (%)	Fraksi air (%)	Tetrasiklin 0,00125%
1	12,5	29,33 ± 2,92	22,42 ± 2,00	30,87 ± 3,36	20,51 ± 0,71	
2	25	31,38 ± 2,24	25,57 ± 4,15	35,52 ± 3,00	25,23 ± 2,95	49,35 ± 2,64
3	50	37,51 ± 3,15	28,93 ± 3,63	40,69 ± 3,19	30,20 ± 2,07	

Bakteri *S. aureus* ATCC 25923 termasuk bakteri gram positif yang bersifat patogen dalam manusia dan memiliki kemampuan menyebabkan penyakit infeksi (Peeters *et al.*, 2008). Biofilm pada *S. aureus* akan membentuk suatu mikrokoloni yang terbungkus oleh matriks polisakarida. Matriks tersebut tersusun atas beberapa komponen seperti DNA ekstraseluler, polisakarida dan beberapa protein (Schwartz *et al.*, 2012).

Pembentukan biofilm lewat *S. aureus* ini menjadi penyebab berbagai penyakit infeksi seperti osteomielitis, endokarditis, dan infeksi pada alat-alat implan. Biofilm pada bakteri akan membuat bakteri tersebut lebih tahan terhadap antibiotik sehingga terkadang untuk membunuhnya dilakukan ditingkatkan konsentrasi/dosis dari antibiotik (Boles & Horswill, 2011).

Hasil persentase dalam menghambat pembentukan biofilm memperlihatkan tetrasiklin

mempunyai rerata penghambatan pembentukan biofilm sebanyak 49,35% atau hampir setara dengan rerata penghambatan pembentukan biofilm dalam fraksi etil asetat dengan konsentrasi 50% yaitu sebesar 40,69%. Penggunaan tetrasiklin sebagai kontrol positif dalam pengujian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas sampel bahan alam dengan sediaan antibiotik yang beredar dimasyarakat.

Hasil pengujiannya mendapatkan hasil tetrasiklin memiliki aktivitas yang paling besar daripada fraksi etil asetat, ekstrak etanol air, serta, fraksi n-heksan daun gamal dalam menghambat pembentukan biofilm. Tetrasiklin ialah antibiotik yang tergolong mampi menjadi penghambat pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* (Dewi, 2013). Tetrasiklin mempunyai aktivitas menghambat *quorum sensing* sewaktu tahap terbentuknya biofilm (Deryabin & Inchagova, 2018).

Prinsip *quorum sensing* (QS) bahwa sewaktu sel tunggal bakteri melepas autoinducer menuju lingkungan, konsentrasi autoinducer terlampaui sulit terdeteksi dikarenakan sudah terencerkan pada lingkungan di dalamnya. Konsentrasi autoinducer cenderung mengalami peningkatan bila populasi bakteinya banyak serta mampu menyentuh konsentrasi ambang sewaktu berbagai sel bakteri mampu mendeteksinya ulang serta melakukan pengaktifan ekspresi berbagai gen target dengan cara yang bersamaan (De Kievit & Iglewski, 2000). Terhambatnya *quorum sensing* disebabkan karena penghambatan sintesis enzim yang bertanggung jawab menghasilkan molekul pemberi sinyal atau protein reseptor memodulasi penginderaan kuorum (Donlan, 2011).

Proses senyawa dalam menghambat pembentukan biofilm yakni melalui penghambatan perlekatan mikroba pada permukaan dan dengan demikian akan mengganggu perkembangan biofilm yang selanjutnya memberi pengaruh pada struktur biofilm terkait peningkatan pertahanan atas antimikroba. Di samping menghambat perlekatan mikroba, senyawa dapat memicu rusaknya matriks ekstraseluler (EPS) biofilm, perihal tersebut cenderung menjadi penyebab terputusnya jalur komunikasi dari nutrisi serta sel dengan mikroba dan dengan demikian mikrobanya cenderung mati ataupun lisis dikarenakan nutrisi yang diperolehnya hilang (Hamzah *et al.*, 2021).

Akumulasi biofilm dalam permukaan padat akan melewati 2 tahapan. Tahap pertama yakni pertumbuhan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) serta sel, sehingga sel biofilm menjadi terakumulasi. Tahapan keduanya ialah

dapat dijumpai penempelan ataupun pelepasan kembali. Bakteri mempergunakan beragam organel protein serta ekstraseluler dalam penginderaan serta menempel di permukaan, tak terkecuali fimbriae, flagel pili, protein luar membran, serta serat curli (Thomas *et al.*, 2004).

Dalam melakukan penghambatan ekspresi gen *icaA* serta *icaD* menjadi penyebab munculnya flavonoid serta tanin yang menjadi penghambat adhesi sel bakteri, baik perlekatan antar bakteri ataupun perlekatan bakteri dengan substrat, di mana adhesi menjadi faktor paling utama untuk membentuk biofilm (Nuryastuti, 2010). Gen tersebut mampu menghasilkan *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA), yang mengatur pembentukan EPS dan agregasi sel. PIA juga memiliki peran atas terbentuknya biofilm bakteri *S. aureus* (Archer *et al.*, 2011). Kemampuan penghambatan biofilm dari suatu senyawa dalam ekstrak maupun fraksi terkait kemampuan penetrasi senyawa tersebut menuju biofilm, yakni mampu berpenetrasi pada lapisan (EPS) maupun lapisan lendir penyelubung bakteri (Yosephine *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil uji antibiofilm fraksi-fraksi serta ekstrak daun gamal terbukti mempunyai aktivitas menghambat pembentukan biofilm biofilm pada *S. aureus* ATCC 25923. Untuk perbedaan kemaknaan nilai pengamatan sampel uji dengan kontrol negatif pada *S. aureus* ATCC 25923, maka dilakukan analisis statistik di uji normalitas dengan hasilnya terdistribusi normal, maka dilanjutkan uji homogenitas menunjukkan homogen penghambatan biofilm hasilnya homogen yang bernilai $p > 0,05$. Datanya kemudian diuji *one way* ANOVA satu jalur diperoleh hasil yakni ditemukan perbedaan signifikan bermakna ($0,00$ ($p < 0,05$)). Data hasil persentase penghambatan biofilm masing-masing konsentrasi ekstrak dan fraksi-fraksi daun gamal 12,5%; 25% dan 50%, kemudian diuji menggunakan SPSS versi 26 untuk melihat perbedaan ekstrak dan fraksi-fraksi daun gamal pada tiap konsentrasi dengan kontrol positif terkait penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus* ATCC 25923.

Hasil perhitungan statistik diperoleh data aktivitas ekstrak dan fraksi-fraksi daun gamal terkait penghambatan biofilm *S. aureus* ATCC 25923 untuk konsentrasi 12,5%; 25% dan 50% terdapat perbedaan signifikan dimana nilai $p > 0,05$ berbeda secara nyata dengan kontrol positif. Di konsentrasi 50% fraksi etil asetat ada perbedaan signifikan dengan konsentrasi 12,5%, 25% fraksi air dan fraksi n-heksan.

Uji degradasi biofilm dimulai dengan bakteri *S. aureus* dibuat menghasilkan biofilm terlebih dahulu, selanjutnya larutan pada plate dicuci untuk

selanjutnya diberi perlakuan ekstrak serta fraksi daun gamal melalui beragam variasi konsentrasi. Hasil nilai absorbansi yang didapat selanjutnya dihitung persentase degradasi biofilm sesuai Tabel 6.

Hasil persentase degradasi biofilm terlihat yang tertinggi adalah fraksi etil asetat dengan konsentrasi 50% yaitu sebesar 37,27%, selanjutnya diikuti dengan ekstrak yang bernilai 34,55%, fraksi air yang bernilai 31,77%, fraksi n-heksan yang bernilai 30,05%. Kontrol positifnya ialah antibiotik menunjukkan aktivitas dengan nilai sebesar 51,66 %. Sejumlah mekanisme terkait penghancuran biofilm

diantaranya ialah pendegradasian matriks biofilm, mati ataupun bocornya sel. Senyawa kimia yang terkandung pada ekstrak dan fraksi daun gamal ialah flavonoid, tanin, alkaloid, saponin serta terpenoid. Senyawa flavonoid mempunyai aktivitas dalam menghancurkan biofilm. Mekanisme flavonoid dalam menghancurkan biofilm dengan cara struktur flavonoid yaitu gugus hidroksil memiliki ikatan dengan protein pada biofilm serta melakukan pembentukan senyawa kompleks sehingga mengakibatkan biofilm terjadi denaturasi (Winarsih *et al.*, 2019).

Tabel 6. Hasil Persentase Rata-Rata Degradasi Biofilm Ekstrak Dan Fraksi Daun Gamal

No.	Konsentrasi (%)	Ekstrak (%)	Fraksi n-heksana (%)	Fraksi etil asetat (%)	Fraksi air (%)	Tetrasiklin 0,00125%
1	12,5	26,95 ± 3,51	21,20 ± 2,89	29,48 ± 3,36	23,30 ± 3,92	
2	25	31,00 ± 3,95	25,42 ± 5,54	32,19 ± 2,51	25,42 ± 3,74	51,66 ± 2,47
3	50	34,55 ± 3,94	30,05 ± 3,21	37,27 ± 2,51	31,77 ± 3,53	

Senyawa tanin merusak biofilm bakteri dengan cara melakukan pengikatan ion besi yang bakteri butuhkan dalam menjaga matriks biofilm yang berakibat pada menurunnya kekekentalan bakteri serta ikatan matriks biofilmnya. Tanin mampu pula berpengaruh pada *Extracellular Polymeric Substance* (EPS), melalui pengurangan jumlah EPS dalam biofilm bakteri (Aini *et al.*, 2016). Mekanisme saponin terkait merusak biofilm melalui pemberian pengaruh pada matriks polimer ekstraseluler pada matriks biofilm bakteri dan dengan demikian terjadilah pengurangan zat polimer serta merubah integritas membran sel bakteri sebagai penyebab terjadinya penurunan stabilitas dinding sel bakterinya (Andrade *et al.*, 2019).

Terpenoid terkait pendegradasian biofilm mampu meminimalkan oembentukan biofilm serta membunuh bakteri. Senyawa triterpenoid mampu membuat membran sel bakteri rusak serta menjadi penyebab bocornya sel bakteri (Khameneh *et al.*, 2019). Berbagai senyawa ini menjadi penghambat serta penghancur biofilm dikarenakan memiliki mekanisme yang mampu menjadi penyebab terdegradasinya matriks biofilm, mati serta bocornya sel. Kemampuan degradasi biofilm pada sebuah zat berkaitan erat dengan kemampuan penetrasi senyawa menuju biofilm, yaitu dengan melakukan penetrasi menuju lapisan (EPS) ataupun lapisan lendir penyelubung bakteri. Di samping perihal tersebut, kemampuan senyawa terkait pendegradasian biofilm ialah melalui penghilangan EPS dalam biofilm (Ardani *et al.*, 2010)

Analisis statistik penghancuran biofilm diawali uji normalitas hasilnya menunjukkan data

persentase degradasi/penghancuran biofilm *S. aureus* ATCC 25923 terdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan uji homogenitas menunjukkan persentase degradasi/penghancuran biofilm hasilnya homogen yang bernilai $p > 0,05$. Datanya kemudian diuji *one way* ANOVA satu jalur yang didapat hasil berupa perbedaan signifikan bermakna yang bernilai signifikan 0,00 ($p < 0,05$). Nilai signifikan antar perlakuan menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan pada ekstrak dan fraksi

KESIMPULAN

Ekstrak dan fraksi n-heksan, air daun gamal, serta etil asetat memiliki aktivitas antibakteri serta antibiofilm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29523. Fraksi teraktif daun gamal yang memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi 50% uji dilusi KHM dan KBM adalah fraksi etil asetat memperlihatkan tak ditemukan pertumbuhan bakteri, sedangkan aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dengan nilai 40,69% dan degradasi biofilm dengan nilai 37,27%

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, S., Wiraningtyas, A., & Bima, K. (2016). Skrining Fitokimia Tanaman Obat di Kabupaten Bima.
- Ahn, K., Baik, B., E., J., Yun, C., H.Han, & H, S. (2018). Lipoteichoic acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- Akharaiyi, F. C., Boboye, B., & Adetuyi, F. C. (2012). Antibacterial, phytochemical and antioxidant

- activities of the leaf extracts of *Gliricidia sepium* and *Spathodea campanulata*. *World Applied Sciences Journal*, 16(4), 523–530.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., & Powers, M.E., dan Shirliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 5.
- Ardani, M., Pratiwi, S.U.T., Hertiani, T. (2010). (2010). Efek Campuran Minyak Atsiri Daun Cengkeh dan Kulit Batang Kayu Manis sebagai Antiplak Gigi. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(3), 191–201.
- Boles, B. R. (2011). *Staphylococcal biofilm disassembly*.
- Budiman, A. & Aulifa, D. . (2020). A Study Comparing Antibacterial Activity of *Ageratum Conyzoides* L. Extract and *Piper betle* L. Extract in Gel Dosage Forms Against *Staphylococcus aureus*. *S. Pharmacognosy Journal*, 12(3), 473-477
- Courtney, A. (2012). *Formularies. Pocket Handbook of Nonhuman Primate Clinical Medicine*. -, 213–218.
- Dermawan, S. (2021). Formulasi gel ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) dan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis*. *Universitas Perintis Indonesia*, 4. Ezzudin, Muhammad R dan Rabeta, M. . (2018). A Potential of Telang Tree (*Clitoria Ternatea*) in Human Health. *Food Research*, 2(5), . 415-420.
- Hamzah, H., Hertiani, T., Utami Tunjung Pratiwi, S., Nuryastuti, T., (2021). Efek Saponin Terhadap Penghambatan Planktonik Dan Mono-Spesies Biofilm *Candida albicans* ATCC 10231 Pada Fase Pertengahan, Pematangan Dan Degradasi. *Majalah Farmaseutik*, 17(2), 198–205.
- Kamal, S. E. (2020). Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etano Daun Gamal (*Gliricidia sepium*) Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Sandi Karsa*, 6(1), 99–104.
- Katrin, D., Idiawati, N., & Sitorus, B. (2015). Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun malek (*Litsea graciae* Vidal) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 1.
- Khan, A. A., Mudassir, J., Mohtar, N., & Darwis, Y. (2013). *Advanced drug delivery to the lymphatic system: Lipid-based nanoformulations*. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 2733–2744.
- Kining E, Falah S, N. N. (2016). Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Air Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Secara In Vitro. *Current Biochemistry*
- Luh, N., Artaningsih, B., Habibah, N., & Mastra, N. (2018). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gamal (*Gliricidia sepium*) pada Berbagai Konsentrasi terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* secara In-Vitro. 9 (November), 336–345.
- Nuryastuti T. (2010). *Environmental signals affecting ica-expression in Staphylococcus epidermidis biofilm*. Thesis. University Medical Center Groningen. Netherlands.
- Peeters, E., nelis, H, j., and C. (2008). Comparison of multiple methods for quanfication of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Microbial Methods*.
- Pelczar MJ, C. E. 2010. (2010). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 1. *Elements Of Microbiology*.
- Saptarini O, R. I. 2021. (2021). Pengaruh minyak atsiri daun jeruk purut (*Citrus Hystrix*) terhadap dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus*. *Berita Biologi Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*.
- Saptarini O, R. I. 2021. (2021). Pengaruh minyak atsiri daun jeruk purut (*Citrus Hystrix*) terhadap dinding sel bakteri *Staphylococcus aureus*. *Berita Biologi Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*.
- Susanty, & Yudhistirani, S. A. (2018). Pengaruh Waktu Ekstraksi Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) Terhadap Kemampuan Daya Hambat Bakteri *Escherichia coli* untuk Pembuatan Hand Sanitizer. *Jurnal Konversi*, 1, 1–10.
- Satria, R., Hakim, A. R., & Darsono, P. V. (2020). Penetapan Kadar Flavonoid Total Dari Fraksi n-Heksana Ekstrak Daun Gelinggang dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Journal of Engineering, Technology, and Applied Science*, 1, 33–46.
- Syarifuddin, A., & Sulistyani, N. (2018). Aktivitas Antibiotik Isolat Bakteri Kp13 dan Analisa Kebocoran Sel Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 16(2), 137–144.

- Tobi, C. H. B., Saptarini, O., & Rahmawati, I. (2022). Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Terhadap *Staphyococcus aureus* ATCC 25923. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 7(1), 56.
- Ulfa, N. K., Fridayanti, A., Maulidya, V., & Rijai, L. (2016). Identifikasi Metabolit Sekunder, Uji Toksisitas Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Gamal (*Gliricidia sepium*). 20–21.
- Wu T, Mengying H, Xixi Z, Ying Z, Tianfu Q, Siyi P, X. X. (2013). A Structure Activity Relationship Study of Flavonoids As Inhibitors of *E. coli* By Membran Interaction Effect. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Yosephine, Wulanjati, Saifullah, D., & Astuti. (2013). Mouthwash formulation of basil oil (*Ocimum basilicum* L.) and in vitro antibacterial and antibiofilm activities against *Streptococcus mutans*. 18(2), 95–102.