

EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) SEBAGAI ANTIBIOFILM *Staphylococcus aureus*

Maghfirah Nur Maulani, Reza Hakim, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang dapat menjadi biofilm pada alat medis yang diawali dengan pembentukan mikrokoloni pada permukaan abiotik. *Moringa oleifera* adalah tanaman yang mempunyai kemampuan sebagai antibakteri, tetapi kemampuannya sebagai antibiofilm belum diketahui. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* sebagai antibiofilm yang dinilai dengan penurunan presentase area biofilm dan jumlah mikrokoloni *S.aureus* secara *in vitro*.

Metode: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental secara *in vitro*. Ekstraksi *Moringa oleifera* menggunakan metode maserasi dengan etanol 70%. Biofilm dibentuk dengan inokulasi *S. aureus* pada media BHI-B + 2% sukrosa, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Penilaian biofilm dilakukan dengan metode pemeriksaan mikroskopis cahaya dan dikuantifikasi menggunakan *ImageJ* untuk mengukur area biofilm dan jumlah mikrokoloni yang dibandingkan dengan Lysorin® sebagai kontrol positif. Uji statistik menggunakan *One-Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* dengan nilai signifikansi $p < 0,05$. Penelitian ini menggunakan 3 kali ulangan dengan 10 lapang pandang untuk pengamatan mikroskopis.

Hasil: Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* menurunkan presentase area biofilm pada dosis 100.000, 200.000 dan 400.000 ppm secara berturut-turut sebesar 29,64±1,6%, 29,1±0,69%, dan 27,87±0,17%. Namun, Lysorin® (kontrol positif) memiliki kemampuan lebih baik menurunkan area biofilm sebesar 6,55±1,31% dibandingkan dengan tanpa perlakuan (kontrol negatif) sebesar 56,25±2,65%. Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* pada dosis 100.000 dan 200.000 ppm menurunkan jumlah mikrokoloni berturut-turut sebesar 1.642±485 *Unit cell*, 887±47 *Unit cell*. Namun, Lysorin® (kontrol positif) memiliki kemampuan lebih baik menurunkan jumlah mikrokoloni hingga 29±9 *Unit cell* dibandingkan dengan tanpa perlakuan (kontrol negatif) sebesar 2.672±292 *Unit cell*. Kontrol positif Lysorin® tidak berbeda signifikan dengan dosis 400.000 ppm yang menurunkan jumlah mikrokoloni sebesar 375±62 *Unit cell*.

Simpulan: Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dosis 400.000 ppm mempunyai kemampuan dalam menurunkan jumlah mikrokoloni. Namun, tidak berbeda signifikan dengan dosis lain dalam menurunkan area biofilm *S.aureus*.

Kata Kunci: *Moringa oleifera*; biofilm; antibiofilm; *Staphylococcus aureus*

*Korespondensi: Rio Risandiansyah, S.Ked., MP., PhD

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144. E-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

EFFECTIVENESS OF *Moringa oleifera* LEAF ETHANOL EXTRACT TOWARDS *Staphylococcus aureus* ANTIBIOFILM

Maghfirah Nur Maulani, Reza Hakim, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* is a bacterium that can become a biofilm on medical devices that begins with the formation of microcolonies on abiotic surfaces. *Moringa oleifera* is a plant that has antibacterial abilities, but its ability as an antibiofilm is unknown. The purpose of this study was to determine the effectiveness of *Moringa oleifera* leaf ethanol extract as an antibiofilm which was assessed by decreasing the percentage of biofilm area and the number of *S. aureus* microcolonies *in vitro*.

Method: This research is an experimental research *in vitro*. *Moringa oleifera* extraction uses maceration method with 70% ethanol. The biofilm was formed by inoculation of *S. aureus* on BHI-B + 2% sucrose media, and incubated at 37°C for 48 hours. Biofilm assessment was performed by microscopic examination method of light and quantified using *ImageJ* to measure the area of biofilm and the number of microcolonies compared to Lysorin® as a positive control. Statistical test using *One-Way ANOVA* and continued with *Post Hoc* test with significance value $p < 0.05$. This study used 3 repetitions with 10 fields of view for microscopic observation.

Results: *Moringa oleifera* leaf ethanol extract decreased the percentage of biofilm area at doses of 100,000, 200,000 and 400,000 ppm respectively 29,64±1,6%, 29,1±0,69%, and 27,87±0,17%. However, Lysorin® (positive control) had a better ability to reduce biofilm area by 6.55±1.31% compared to no treatment (negative control) by 56.25±2.65%. *Moringa oleifera* leaf ethanol extract at doses of 100,000 and 200,000 ppm decreased the number of microcolonies respectively by 1,642±485 cell units, 887±47 cell units. However, Lysorin® (positive control) had a better ability to reduce the number of microcolonies to 29±9 cell units compared to 2,672±292 units of untreated (negative control) cells. The positive control of Lysorin® was not significantly different from the 400,000 ppm dose which decreased the number of microcolonies by 375±62 cell units.

Conclusion: *Moringa oleifera* leaf ethanol extract dose of 400,000 ppm has the ability to reduce the number of microcolonies. However, it did not differ significantly from other doses in lowering the biofilm area of *S. aureus*.

Keywords: *Moringa oleifera*; biofilm; antibiofilm; *Staphylococcus aureus*

*Correspondence: Rio Risandiansyah, S.Ked., MP., PhD

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144. E-mail: riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus adalah salah satu bakteri penyebab terjadinya infeksi nosokomial.¹ Sekitar 65% infeksi nosokomial diperkirakan berhubungan dengan terbentuknya biofilm.² Sumber infeksi nosokomial salah satunya terjadi karena peralatan medis yang tidak steril. Peralatan medis yang tidak steril dapat terkontaminasi bakteri sehingga mengakibatkan terbentuknya biofilm.³ *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang dapat menjadi biofilm di berbagai macam media terutama peralatan medis seperti kateter, implan dan prostesis sendi.^{4,5} *Staphylococcus aureus* yang menempel pada peralatan medis dapat menyebabkan endokarditis, osteomielitis, bakteremia, pneumonia, dan sebagainya.⁶

Biofilm merupakan suatu komunitas mikroorganisme yang menempel pada suatu permukaan dan terbungkus dalam *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) yang menyusun 85% volume biofilm.⁷ *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) pada biofilm memberi perlindungan mikroorganisme dari kerja sistem kekebalan imun serta obat antimikroba.^{8,9} Biofilm yang menempel pada peralatan medis dapat menyebabkan gangguan kesehatan yang serius dan mempengaruhi kinerja dari alat kesehatan tersebut.¹⁰

Penggunaan disinfektan, seperti natrium hipoklorit, telah terbukti efektif dalam mengatasi biofilm. Namun, dalam penggunaannya dapat menimbulkan iritasi jika bersentuhan langsung dengan kulit.¹¹ Selain natrium hipoklorit, hidrogen peroksida juga digunakan sebagai disinfektan untuk peralatan medis, tetapi disinfektan jenis ini bersifat korosif pada peralatan medis seperti endoskopi fleksibel dan dapat menghitamkan lapisan logam.¹² Sehingga tidak bisa digunakan pada permukaan biotik atau yang akan bersentuhan dengan organ tubuh. Oleh karena itu, perlunya solusi alternatif untuk mengatasi biofilm yang lebih efisien dan aman.

Tanaman kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu potensi solusi. Pada penelitian sebelumnya ekstrak etanol dari daun *Moringa oleifera* memiliki senyawa aktif yang berpotensi sebagai agen antibakteri. Senyawa ini seperti flavonoid, steroid, alkaloid, tanin, dan saponin dapat memiliki efek antimikroba, antikanker, dan antivirus.^{13,14,15} Pada penelitian yang dilakukan sebelumnya fraksi dari ekstrak etanol *Moringa oleifera* pada dosis 200.000 ppm memiliki potensi menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, tetapi kemampuan *Moringa oleifera* untuk mengatasi biofilm *S. aureus* belum diketahui.¹⁶

Oleh karena itu, penelitian eksperimental ini dilakukan untuk mengetahui potensi antibiofilm terhadap *S.aureus* setelah pemberian ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dengan menurunkan presentase area biofilm dan jumlah mikrokoloni *S. aureus*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru mengenai penghancuran biofilm pada peralatan medis dan mengembangkan strategi yang lebih efektif dalam menghindari pembentukan biofilm yang disebabkan oleh *S. aureus*.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental laboratorium menggunakan desain penelitian *in vitro* dengan menurunkan presentase area biofilm dan jumlah mikrokoloni *S. aureus* menggunakan senyawa aktif ekstrak etanol daun *Moringa oleifera*. Simplisia *Moringa oleifera* didapat UPT Laboratorium Herbal Materia Medika Batu dengan nomor surat 067/ 684/ 102.20/ 2023. Waktu penelitian dilakukan bulan Juni 2023 di Laboratorium Terpadu FK UNISMA dan Laboratorium Biomedik FK UMM.

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera*

Ekstraksi dilakukan dengan maserasi menggunakan serbuk daun *Moringa oleifera* yang ditimbang seberat 100 gr dan direndam pelarut etanol 70% sebanyak 500 mL (1:5). Perendaman serbuk daun *Moringa oleifera* dan pelarut etanol 70% dilakukan selama 24 jam dan diaduk sesekali. Hasil rendaman disaring dengan kain flanel dan ampasnya diperas hingga diperoleh ekstrak cair pertama. Penyarian diulang menggunakan sisa ampas dengan etanol 70% sebanyak 500 mL. Perendaman sisa ampas daun *Moringa oleifera* dan pelarut etanol 70% dilakukan selama 24 jam dan diaduk sesekali. Hasil rendaman disaring dengan kain flanel kemudian ampasnya diperas hingga diperoleh ekstrak cair kedua. Hasil dari kedua maserat diuapkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* yang kental.^{17,18}

Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera*

Uji Flavonoid

Sebanyak 1 mL ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dipanaskan kemudian disaring. Filtrat diambil 0,5 mL dan dimasukkan 5 mL NH₃ encer dan H₂SO₄ pekat beberapa tetes. Terbentuknya warna kuning menandakan kandungan senyawa flavonoid.¹⁹

Uji Alkaloid

Serbuk daun *Moringa oleifera* sebanyak 2 g dilarutkan dalam 10 mL kloroform. Ditambahkan 5 mL kloroform-amonia 0,05 N dan asam sulfat 2 N. Dengan pereaksi Mayer, menandakan kandungan senyawa alkaloid jika terdapat endapan berwarna putih dan pereaksi Dragendorff jika terdapat endapan berwarna jingga hingga merah.²⁰

Uji Tanin

Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* ditambahkan larutan FeCl₃ 5%. Terbentuknya warna biru kehitaman atau hijau kecoklatan menandakan senyawa tanin.²¹

Uji Terpenoid dan Steroid

Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dikeringkan di atas papan spot tes dan ditambahkan 3 tetes Ac₂O dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet menandakan kandungan senyawa triterpenoid. Sedangkan terbentuknya cincin biru kehijauan menandakan kandungan senyawa steroid.²²

Uji Saponin

Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* sebanyak 1 g ditambahkan air hangat dan dikocok secara kuat. Terbentuknya busa tidak kurang dari 10 menit dan jika ditambahkan 1 tetes HCl 2N busanya tidak hilang, menandakan kandungan senyawa saponin.²²

Uji Pembentukan Biofilm

Pada uji pembentukan biofilm menggunakan media cair *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B) ditambahkan sukrosa 2% dan dituangkan ke dalam setiap cawan petri yang berisi *object glass* steril hingga permukaannya terendam. Biakan peremajaan bakteri yang telah diinkubasi diambil dengan ose steril dan disuspensikan dalam tabung berisi 2 mL larutan NaCl 0,9%, dan di vortex hingga homogen, kemudian disesuaikan dengan standar *McFarland* 0,5.²³ Pada masing-masing cawan petri yang sudah diisi *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B) + sukrosa 2% ditambahkan 1 mL bakteri *Staphylococcus aureus* dengan standar *McFarland* 0,5.²⁴ Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam hingga terbentuk adanya plak pada biakan.²⁵

Uji Antibiofilm

Setelah biofilm terbentuk, *object glass* dibilas menggunakan larutan *normal saline* sebanyak dua kali untuk menghilangkan bakteri planktonik yang mengambang secara bebas. Kemudian, dilakukan pewarnaan dengan *crystal violet* 0,1% 2 ml dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya, *crystal violet* 0,1% dibuang dan dibilas dengan *normal saline*.²⁶ Setelah itu, dilakukan pewarnaan untuk mengikat EPS yang menempel menggunakan *lactophenol cotton blue* 2 ml dan didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas menggunakan *normal saline*.²⁷ Pemberian perlakuan sesuai dengan kelompok kontrol serta variasi dosis dari ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* direndam selama 5 menit dan dibilas menggunakan *normal saline*. Lalu, diwarnai kembali menggunakan *lactophenol cotton blue* selama 1 menit dan dibilas dengan *normal saline*. *Object glass* dikeringkan pada suhu ruang. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop trinokuler dengan *immersion oil* pada perbesaran 1000x untuk mengamati jumlah mikrokoloni *S.aureus*. Kemudian dilakukan pengambilan dokumentasi untuk penghitungan presentase area biofilm dan jumlah mikrokoloni dengan aplikasi *ImageJ*.²⁶

Analisa Data dan Statistik

Uji statistik dilakukan dengan menggunakan normalitas dan homogenitas. Jika data terdistribusi dengan normal dan homogen ($p > 0,05$) maka dilakukan uji *One-Way Analysis Of Variance* yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui perbandingan antar perlakuan.

HASIL PENELITIAN

Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia dari ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera*

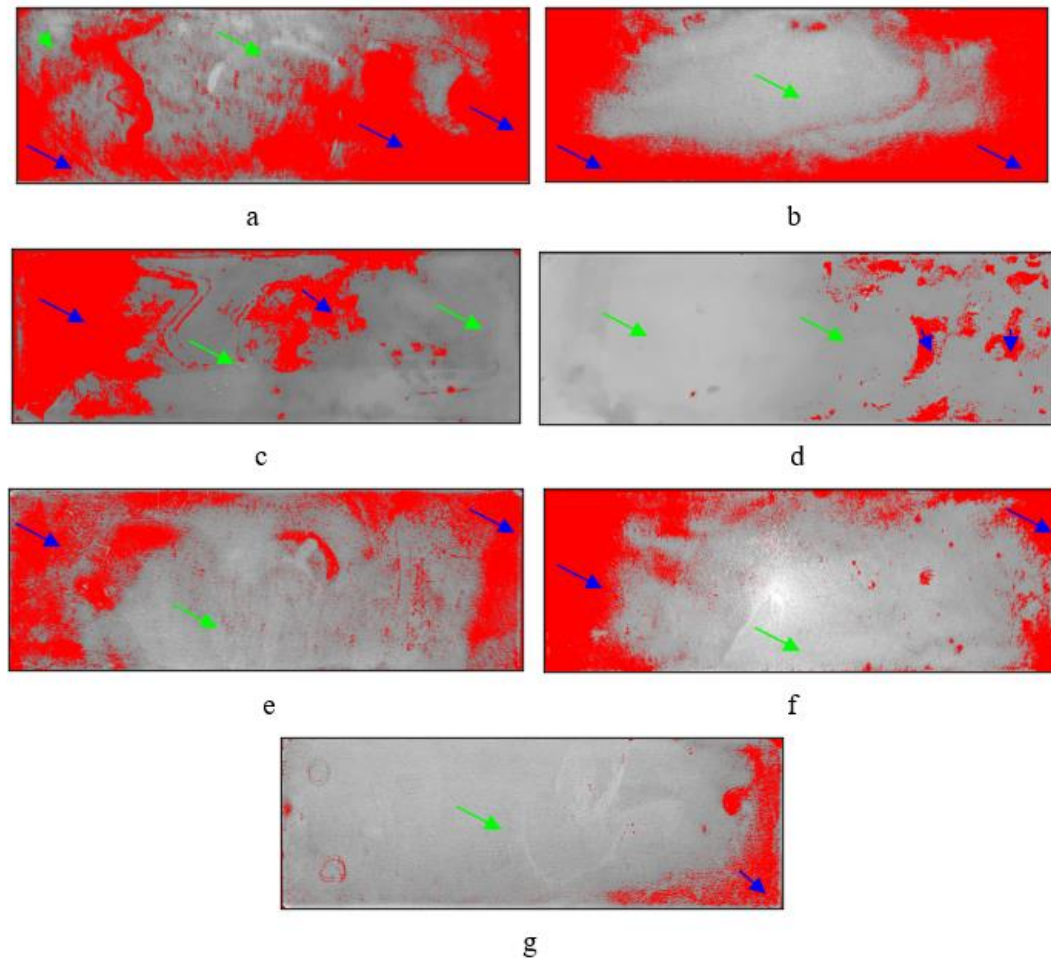
Senyawa	Perubahan warna	Hasil
Flavonoid	Berwarna kuning	+
Alkaloid	Endapan berwarna jingga	+
Tanin	Berwarna hijau kecoklatan	+
Steroid	Terbentuk cincin biru kehijauan	+
Saponin	Terbentuk busa	+

Keterangan: + menandakan adanya senyawa aktif.

Uji Antibiofilm Berdasarkan Presentase Area Biofilm *S. aureus*

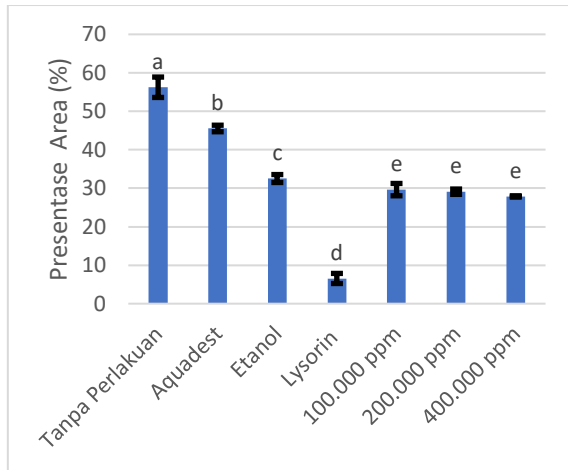
Hasil perhitungan presentase area biofilm *S. aureus* pada uji antibiofilm ekstrak etanol *Moringa oleifera* dapat dilihat pada **Gambar 1 dan 2**. Penghitungan presentase area biofilm *S. aureus* yang didapatkan pada *object glass* sebelum pencucian sebesar $56,25 \pm 2,65\%$ dan setelah pencucian menggunakan *aquadest* sebesar $45,53 \pm 0,85\%$. Pada pencucian yang diberikan etanol presentase area biofilm sebesar

$32,53 \pm 1,03\%$ sedangkan pada *object glass* yang menggunakan Lysorin® sebesar $6,55 \pm 1,31\%$. Pada ekstrak dosis 100.000, 200.000, dan 400.000 ppm secara berturut-turut sebesar $29,64 \pm 1,6\%$, $29,1 \pm 0,69\%$, dan $27,87 \pm 0,17\%$ yang tidak berbeda signifikan. Penurunan area biofilm dibandingkan tanpa perlakuan pada dosis ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* adalah 48%, 49%, dan 51% sedangkan Lysorin 88%.



Gambar 1. Hasil Penghitungan Presentase Area Biofilm Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera* setelah dikuantifikasi menggunakan *ImageJ*.

Keterangan: Hasil penghitungan presentase area biofilm setelah dikuantifikasi menggunakan *ImageJ*. Tanda panah berwarna biru menunjukkan biofilm yang terukur dan panah berwarna hijau menunjukkan area yang bukan biofilm. (a): Tanpa perlakuan $56,25 \pm 2,65\%$; (b): *Aquadest* $45,53 \pm 0,85\%$; (c) Etanol $32,53 \pm 1,03\%$; (d): Lysorin® $6,55 \pm 1,31\%$; (e): Dosis 100.000 ppm ekstrak etanol *Moringa oleifera* $29,64 \pm 1,6\%$; (f): Dosis 200.000 ppm ekstrak etanol *Moringa oleifera* $29,1 \pm 0,69\%$; dan (g): Dosis 400.000 ppm ekstrak etanol *Moringa oleifera* $27,87 \pm 0,17\%$.

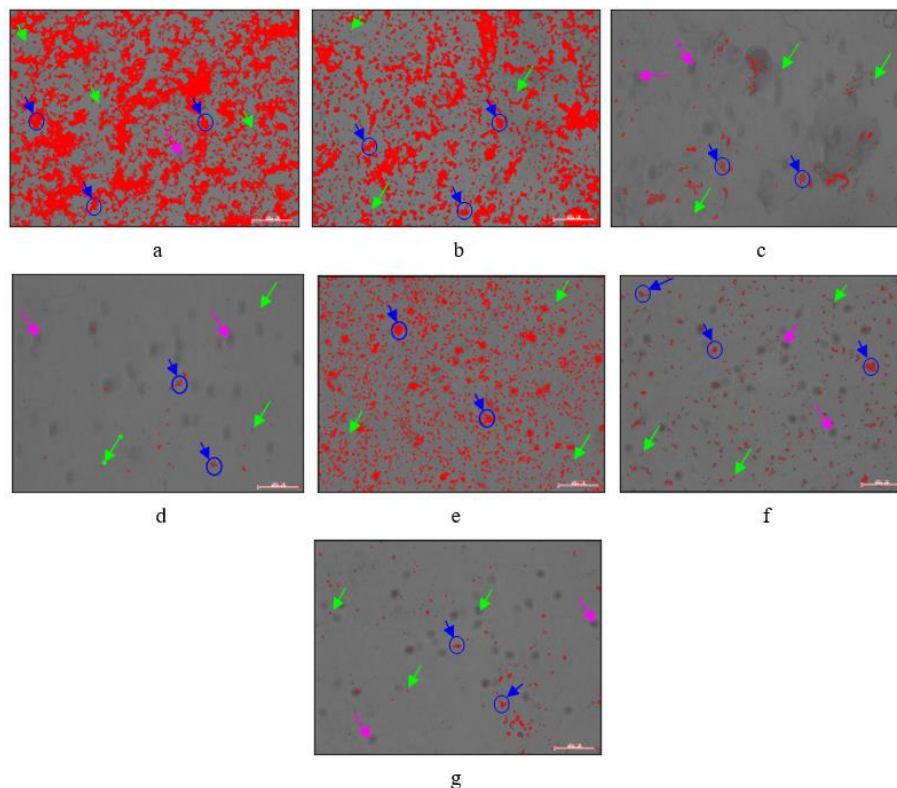


Gambar 2. Histogram Penghitungan Presentase Area Biofilm Ekstrak Etanol *Moringa oleifera*

Keterangan: ^{a-e} Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan signifikan.

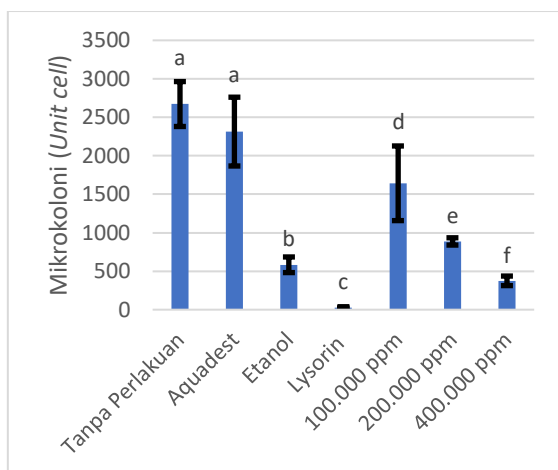
Uji Antibiofilm Berdasarkan Jumlah Mikrokoloni

Hasil perhitungan jumlah mikrokoloni bakteri *S.aureus* pada uji antibiofilm ekstrak etanol *Moringa oleifera* dapat dilihat pada **Gambar 3 dan 4**. Penghitungan jumlah mikrokoloni *S. aureus* yang didapatkan pada *object glass* sebelum pencucian sebesar 2.672 ± 292 *Unit cell* dan setelah pencucian menggunakan *aquadest* sebesar 2.314 ± 447 *Unit cell*. Pada pencucian yang diberikan etanol jumlah mikrokoloni *S. aureus* sebesar 583 ± 102 *Unit cell* sedangkan pada *object glass* yang menggunakan Lysorin® sebesar 29 ± 9 *Unit cell*. Pada ekstrak dosis 100.000, 200.000, dan 400.000 ppm secara berturut-turut sebesar 1.642 ± 485 *Unit cell*, 887 ± 47 *Unit cell*, dan 375 ± 62 *Unit cell* yang berbeda secara signifikan. Penurunan jumlah mikrokoloni dibandingkan tanpa perlakuan pada dosis ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* adalah 39%, 67%, dan 86% sedangkan Lysorin 99%.



Gambar 3. Hasil Dokumentasi Jumlah Mikrokoloni *S. aureus* dari Mikroskop Trinokuler pada Perbesaran 1000x Sesudah Dikuantifikasi Menggunakan *ImageJ*.

Keterangan: Hasil dokumentasi jumlah mikrokoloni *S. aureus* dari Mikroskop Trinokuler Pada Perbesaran 1000x sesudah dikuantifikasi menggunakan *ImageJ*. Tanda panah berwarna biru menunjukkan mikrokoloni yang terukur, panah berwarna ungu menunjukkan debris, dan panah berwarna hijau menunjukkan sel tunggal. (a): Tanpa perlakuan 2.672 ± 292 *Unit cell*; (b): *Aquadest* 2.314 ± 447 *Unit cell*; (c) Etanol 583 ± 102 *Unit cell*; (d): Lysorin® 29 ± 9 *Unit cell*; (e): Dosis 100.000 ppm ekstrak etanol *Moringa oleifera* 1.642 ± 485 *Unit cell*; (f): Dosis 200.000 ppm ekstrak etanol *Moringa oleifera* 887 ± 47 *Unit cell*; dan (g): Dosis 400.000 ppm ekstrak etanol *Moringa oleifera* 375 ± 62 *Unit cell*.



Gambar 4. Histogram Perhitungan Jumlah Mikrokoloni Ekstrak Etanol *Moringa oleifera*

Keterangan: ^{a-e} Perbedaan notasi menunjukkan perbedaan signifikan.

PEMBAHASAN

Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera*

Kandungan senyawa aktif yang didapatkan dari ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* yaitu flavonoid, alkaloid, tanin, steroid, dan saponin. Pada penelitian ini melakukan uji fitokimia secara kualitatif tetapi untuk uji secara kuantitatif belum dilakukan. Penelitian ini menggunakan ekstraksi dengan metode maserasi. Kelebihan dari metode maserasi yaitu caranya yang mudah serta tidak melibatkan adanya proses pemanasan sehingga meminimalisir kerusakan pada bahan alam.²⁸ Pelarut yang digunakan yaitu etanol 70%. Pemilihan pelarut etanol 70% memiliki kelebihan yaitu tingkat toksisitas rendah sehingga aman jika digunakan, dapat menarik lebih banyak senyawa aktif dibandingkan pelarut organik lainnya serta dapat menarik senyawa dari non polar hingga polar.^{29,30} Hasil uji fitokimia ini sejalan dengan penelitian lain bahwa ekstrak etanol 70% pada daun *Moringa oleifera* dengan menggunakan metode maserasi mengandung senyawa aktif flavonoid, alkaloid, tanin, steroid, dan saponin.^{15,31}

Uji Antibiofilm Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera* pada Pengukuran Presentase Area *S. aureus*

Hasil presentase area biofilm *S. aureus* pada dosis 100.000, 200.000, dan 400.000 ppm memiliki kemampuan menurunkan presentase area biofilm tetapi pada ketiga dosis tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Ketiga dosis tersebut memiliki perbedaan signifikan dengan kontrol negatif tanpa perlakuan, kontrol perancu aquadest, kontrol

perancu etanol dan kontrol positif Lysorin®. Kontrol positif Lysorin® memiliki potensi lebih baik dalam menurunkan presentase area biofilm *S. aureus* karena salah satunya memiliki kandungan klorin yang mempunyai kemampuan sebagai disinfektan. Kandungan klorin dapat merusak sel bakteri serta EPS dalam biofilm.¹²

Pada pemakaian Lysorin® sebagai kontrol positif tidak selalu menggunakan kadar 100% sehingga akan memiliki efektivitas pembersihan mikroba yang bervariasi. Pada pemakaian Lysorin® yg dianjurkan adalah 24 ml dalam 1L air dengan kadar 1,5%. Pada penelitian ini dosis Lysorin® yang digunakan adalah dosis maksimal sehingga memiliki efektivitas pembersihan mikroba yang maksimal. Hal ini terlihat dari penurunan area biofilm sebesar 99%, sesuai dengan klaim dari produsen bahwa Lysorin® bisa membunuh 99,9 % bakteri.

Terbentuknya area biofilm diawali dengan penempelan bakteri pada permukaan abiotik, kemudian bereplikasi lalu membentuk mikrokoloni dan menghasilkan EPS yang akan terlihat seperti plak. Pada penelitian ini dilakukan pewarnaan *crystal violet* untuk mewarnai bakteri dan pewarnaan *lactophenol cotton blue* (LCPB) untuk mewarnai daerah EPS yang terdiri dari polisakarida. Jika semakin luas plak yang terbentuk maka area biofilm yang terbentuk juga akan semakin tinggi. Namun, saat dilakukan pengamatan pada penelitian ini pewarnaan LPCB tidak terlalu terwarna dikarenakan keterbatasan penelitian.

Uji fitokimia dari ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* terdapat kandungan senyawa aktif flavonoid, alkaloid, tanin, steroid, dan saponin. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa aktif flavonoid, saponin, fenol, tanin, alkaloid dan steroid memiliki aktivitas sebagai antibiofilm.³² Pada penelitian ini didapatkan kemampuan dari ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dalam menurunkan presentase area biofilm *S. aureus* yaitu dosis 100.000, 200.000, dan 400.000 ppm dikarenakan kandungan senyawa aktif dari ekstrak tersebut yang memberikan efek dalam menghambat biofilm.³² Adanya variasi untuk menghilangkan biofilm masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Penelitian ini hanya menggunakan 3 dosis uji sedangkan penggunaan dosis yang diteliti seharusnya menggunakan minimal 6 dosis untuk mengetahui dosis minimal dan maksimal yang bekerja.³³ Selain itu, juga dilakukan pencarian *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) untuk menghitung dosis minimum yang bisa menghambat biofilm dan *Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC) untuk

menghitung dosis minimum yang dapat mengeradikasi biofilm.³⁴

Uji Antibiofilm Ekstrak Etanol Daun *Moringa oleifera* pada Perhitungan Jumlah Mikrokoloni *S. aureus*

Hasil uji antibiofilm berdasarkan jumlah mikrokoloni pada dosis 100.000, 200.000, dan 400.000 ppm dapat menurunkan jumlah mikrokoloni secara signifikan. Dari ketiga dosis tersebut, pada dosis 400.000 ppm memiliki kemampuan paling baik dalam menurunkan jumlah mikrokoloni, karena semakin meningkatnya konsentrasi yang digunakan maka semakin banyak mengandung senyawa aktif yang memberikan efek sebagai antibiofilm.³² Namun, Kontrol positif Lysorin® memiliki potensi lebih baik dalam menurunkan jumlah mikrokoloni karena fungsinya sebagai desinfektan.

Kontrol perancu etanol juga memiliki kemampuan dalam menghambat jumlah mikrokoloni tetapi tidak sebesar dosis 400.000 ppm, dugaan penurunan jumlah mikrokoloni disebabkan tingginya senyawa aktif yang terkandung didalamnya. Jika ingin memberikan hasil yang lebih nyata maka sebaiknya etanol tidak digunakan dalam resuspensi ekstrak dan sebaiknya pasca evaporasi resuspensi menggunakan air.

Pada penelitian sebelumnya, kandungan senyawa aktif yang dimiliki ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* dapat mencegah terbentuknya biofilm.³² Cara kerja dari senyawa aktif flavonoid dan tanin sebagai antibiofilm dengan melakukan penghambatan terbentuknya biofilm melalui interaksi secara fisik. Senyawa aktif tersebut mengikat protein adhesi bakteri yang digunakan sebagai reseptor pada permukaan bakteri sehingga dapat mencegah terjadinya adhesi serta menghambat sintesis protein untuk membentuk dinding sel.³⁵ Senyawa aktif alkaloid sebagai antibiofilm dapat menghambat pembentukan EPS dan proses *quorum sensing*.³⁶ Senyawa aktif saponin dibedakan menjadi triterpenoidal saponin serta steroidal saponin. Senyawa steroidal saponin yang berperan sebagai antibiofilm dapat mengganggu kestabilan EPS dan pengikatan sisi aktif enzim *mannitol dehydrogenase* dan *eDNA* dalam sintesis alginat yang merupakan komponen utama EPS dapat menghambat pembentukan biofilm.³²

Keterbatasan Penelitian

Salah satu keterbatasan pada penelitian ini adanya pengaruh faktor eksternal yang terjadi diantaranya saat diberikan pewarnaan LPCB untuk mewarnai polisakarida kemungkinan juga diperoleh dari ekstrak etanol *Moringa oleifera* sehingga saat dilakukan analisa pada aplikasi *ImageJ* sulit membedakan antara bakteri dan ekstrak. Fitur *grey scale* pada aplikasi *ImageJ* akan mendeteksi adanya biofilm dari pewarna *lactophenol cotton blue*. Pada penelitian ini penghitungan area biofilm menggunakan *software ImageJ* untuk menghilangkan adanya bias peneliti.

KESIMPULAN

Berdasarkan analisis data dan pembahasan pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Ketiga dosis ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* memiliki potensi menurunkan area biofilm *S. aureus* yang tidak memiliki perbedaan signifikan dari dosis terendah sebesar 48%, 49%, dan 51% dibandingkan kontrol negatif. Namun, lebih lemah daripada Lysorin® sebesar 88%.
2. Ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* yang memiliki potensi menurunkan jumlah mikrokoloni *S. aureus* yaitu 400.000 ppm sebesar 86%. Namun, lebih lemah daripada Lysorin® sebesar 99%.

SARAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan kali ini, maka saran pada penelitian selanjutnya adalah :

1. Menggunakan Lysorin® dengan kadar 1,5%.
2. Melakukan optimasi dosis untuk mencari dosis efektif dalam menurunkan presentase biofilm pada *object glass*.
3. Melakukan pencarian *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) untuk menghitung dosis minimum yang bisa menghambat biofilm dan *Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC) untuk menghitung dosis minimum yang dapat mengeradikasi biofilm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih saya sampaikan kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa dan FK UNISMA yang telah menginsentif penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Konoralma, K. (2019). Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial di Rumah Sakit Umum GMIM Pancaran Kasih Manado. *Jurnal KESMAS*, 8(1), 24.
2. Mah, T.-F. C., & O'toole, G. A. (2001). Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents. *TRENDS in Microbiology*, 9(1), 34. <http://tim.trends.com0966>
3. Fauzi, A., & Thunru, M. (2018). Pola kuman pada alat sterilisasi dan alat medis pakai ulang di instalasi sterilisasi Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Hasanuddin. *Makassar Dent J*, 7(3), 125–127.
4. Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. (2017). Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. *Molecular Microbiology*, 104(3), 365–376. <https://doi.org/10.1111/mmi.13634>
5. Utami, P. S. M., Noorhamdani, & Rahayu, M. (2020). Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm Staphylococcus aureus secara In Vitro. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 6(3), 168–173.
6. Peng, Q., Xiaohua, T., Wanyang, D., Ning, S., & Yuan, W. (2023). A Review of Biofilm Formation of Staphylococcus aureus and Its Regulation Mechanism. *MDPI*, 12(12), 1–21.
7. Phillips, C. A. (2016). Bacterial biofilms in food processing environments: a review of recent developments in chemical and biological control. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(8), 1731–1743. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13159>
8. Puca, V., Marulli, R. Z., Grande, R., Vitale, I., Niro, A., Molinaro, G., Prezioso, S., Muraro, R., & Giovanni, D. P. (2021). Microbial species isolated from infected wounds and antimicrobial resistance analysis: Data emerging from a three-years retrospective study. *Antibiotics*, 10(10), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101162>
9. Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 7, Issue 4, pp. 493–512). Future Science Ltd. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
10. Purbowati, R. (2016). Hubungan Biofilm dengan Infeksi : Implikasi pada Kesehatan Masyarakat dan Strategi Mengontrolnya. *Ilmiah Kedokteran*, 5(1), 1–14.
11. Aranke, M., Moheimani, R., Phuphanich, M., Kaye, A. D., Ngo, A. L., Viswanath, O., & Herman, J. (2021). Disinfectants In Interventional Practices. *Curr Pain Headache Rep*, 25(21), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11916-021-00938-3/Published>
12. Lineback, C. B., Nkemngong, C. A., Wu, S. T., Li, X., Teska, P. J., & Oliver, H. F. (2018). Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(154), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0447-5>
13. Nurjannah, I., Mustariani, B. A. A., & Suryani, N. (2022). Skrining Fitokimia dan Uji Antibakteri Ekstrak Kombinasi Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) dan Kelor (*Moringa oleifera* L.) sebagai Zat Aktif pada Sabun Antibakteri. *SPIN*, 4(1), 23–36. <https://doi.org/10.20414/spin.v4i1.4801>
14. Rivai, A. T. O. (2020). Identifikasi Senyawa yang Terkandung pada Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesian Journal of Fundamental Sciences (IJFS)*, 6(2), 63–70.
15. Tutik, Dwipayana, I. N. A., & Elsyana, V. (2018). Identifikasi dan Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kelor pada Variasi Pelarut dengan Metode DPPH. *Jurnal Farmasi Malahayati*, 1(2), 80–87.
16. Firmansyah, A., Bintari, Y. R., Risandiansyah R. (2023). Potensi Antibakteri dari Ekstrak Etanol dengan Fraksi Ekstrak Etanol Daun Moringa oleifera Lam. *Jurnal Kedokteran Komunitas*. 1-6
17. Fauzi, R., Fatmawati, A., & Emelda. (2020). Efek Anti diare Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.) pada Mencit Putih Jantan. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*, 6(1), 35–39. <http://pji.ub.ac.id>
18. Munira, M., Amalia, D., Khazanah, W., & Nasir, M. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk) Berdasarkan Perbedaan Waktu Panen. *Indonesian Journal for Health Sciences*, 5(2), 69–76.
19. Arrisujaya, D., Susanty, D., & Kusumah, R. R. (2019). Skrining Fitokimia dan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Aseton dan Etil Asetat Biji Buah Bisbul (*Diospyros discolor*) Tumbuhan Endemik Bogor. *Jurnal STIKES Cendekia Utama Kudus*, 3(2), 3.

- <http://cjp.jurnal.stikeskendekiautamakudus.ac.id>
20. Wardhani, A. P. R., & Supartono. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) pada Bakteri. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 4(1). <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs>
 21. Cahyaningsih, E., Megawati, F., & Artini, N. P. E. (2021). Uji Efektivitas Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia* L.) sebagai Bahan Pengawet Alami Buah Tomat. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 7(1), 41–46. <https://doi.org/10.36733/medicamento.v7i1.1558>
 22. Artini, P. E. U. D., Astuti, K. W., & Warditiani, N. K. (2013). Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4).
 23. Sari, D. M., Sammulu, S. F., Napitupulu, T. Br., & Warni, S. (2023). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Matenasi (*Garcinia* sp.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. *SEHATMAS (Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat)*, 2(1), 278–287. <https://doi.org/10.55123/sehatmas.v2i1.1181>
 24. Yang, S. J., Han, S. H., Lee, A. R., Jun, J. H., Son, M. W., Oh, S. H., Kim, J., & Paik, S. Y. (2015). Evaluation of antimicrobial effects of commercial mouthwashes utilized in South Korea. *BMB Reports*, 48(1), 42–47. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2015.48.1.090>
 25. Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well Microtiter Plate. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 631–641. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48
 26. Haridoss, M., Kumar, A., Alam, A., Priyam, Sekar, U., Sumantran, V. N., & Vaidyanathan. (2013). Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51, 764–772. <https://www.researchgate.net/publication/259497577>
 27. Ericksen, B. (2017). Quantification of Polysaccharides Fixed to Gram Stained Slides Using Lactophenol Cotton Blue and Digital Image Processing. *F1000Research*, 4(1), 1–17. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5779.1>
 28. Susanty, & Bachmid, F. (2016). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks terhadap Kadar Fenolik dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays* L.). *KONVERSI*, 5(2), 88.
 29. Hasanah, N., & Novian, D. R. (2020). Analisis Ekstrak Etanol Buah Labu Kuning (*Cucurbita Moschata* D.). *Jurnal Ilmiah Farmasi Para Pemikir*, 9(1), 2020–2054. <http://ejournal.poltektegal.ac.id/index.php/parape>
 30. Padmasari, P. D., Astuti, K. W., & Warditiani, N. K. (2013). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 366, 1–7.
 31. Pratama, K. A. K., Putra, A. P., & Puspaningrat, L. P. D. (2023). Formulasi Krim Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera* Lam) sebagai Penyembuhan Luka Bakar pada Tikus Putih Jantan (*Rattus Norvegicus*). *Jurnal Farmasi Kryonaut*, 2(2), 85–96.
 32. Rosyada, A. G., Prihastuti, C. C., Sari, D. N. I., Setiawati, Ichsyani, M., Laksitasari, A., Andini, R. F., & Kurniawan, A. A. (2023). Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: Penelitian Eksperimental Laboratoris. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*, 35(1), 33–40. <https://doi.org/10.24198/jkg.v35i1.42451>
 33. Loresta, S., Murwani, S., & Pratiwi, T. (2014). Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *Biofulin : J Bioadhesion Biofilm Res.*, 1(4), 1–8.
 34. Thieme, L., Hartung, A., Tramm, K., Klinger-Strobel, M., Jandt, K. D., Makarewicz, O., & Pletz, M. W. (2019). MBEC Versus MBIC: The Lack of Differentiation between Biofilm Reducing and Inhibitory Effects as a Current Problem in Biofilm Methodology. *Biological Procedures Online*, 21(18), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12575-019-0106-0>
 35. Tobi, C. H. B., Saptarini, O., & Rahmawati, I. (2022). Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 7(1), 56–70. <https://doi.org/10.20961/jpscr.v7i1.43698>

36. Miller, T., Waturangi, D. E., & Yogiara. (2022). Antibiofilm properties of bioactive compounds from Actinomycetes against foodborne and fish pathogens. *Scientific Reports*, 12(18614), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23455-8>