EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL RIMPANG LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata)* TERHADAP ANTIBIOFILM *Staphylococcus aureus*

Annisa Kurniawati, Reza Hakim, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang dapat membentuk biofilm pada permukaan abiotik yang dimulai dengan adhesi. *Alpinia purpurata* adalah tanaman yang mempunyai kemampuan sebagai antibakteri, tetapi belum terbukti sebagai antibiofilm. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol rimpang *A.purpurata* terhadap jumlah mikrokoloni dan persentase luas area biofilm dari *S. aureus*.
Metode: Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental *in vitro*. Ekstraksi *A.purpurata* dilakukan melalui metode maserasi menggunakan etanol 70%. Pembentukan biofilm melibatkan inokulasi *S. aureus* pada media BHI-B + sukrosa 2%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pengamatan biofilm dilakukan melalui analisis mikroskopis menggunakan mikroskop trinokuler dan aplikasi *ImageJ* dengan mengukur luas biofilm dan jumlah mikrokoloni yang dibandingkan dengan Lysorin® sebagai kontrol positif. Analisis statistik dilakukan menggunakan *One-Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* dengan nilai signifikansi $p<0,05$.
Hasil: Uji antibiofilm pada EAP menunjukkan perbedaan signifikan pada jumlah mikrokoloni S. aureus di konsentrasi 50.000 ppm (2.247±65 Unit), 100.000 ppm (1.929±102 Unit), dan 200.000 ppm (1.491±132 Unit) dibandingkan tanpa perlakuan (4.299±302 Unit). Namun, Lysorin® lebih efektif, menurunkan jumlah mikrokoloni menjadi (26±14 Unit). Konsentrasi 200.000 ppm EAP tidak berbeda secara signifikan dengan etanol 70% (1.612±107 Unit). Pengukuran persentase luas area biofilm menunjukkan bahwa konsentrasi 50.000 ppm (35,48±1,48%), 100.000 ppm (35,19±1,42%), dan 200.000 ppm (30,51±1,06%) serupa dengan etanol 70% (34,64±2,02%). Namun, ketiga konsentrasi tersebut berbeda secara signifikan dengan Lysorin® (16,27±1,33%), menunjukkan Lysorin® memiliki potensi lebih tinggi dalam mengurangi luas area biofilm.
Kesimpulan: Ekstrak etanol *A.purpurata* pada dosis 200.000 ppm memiliki kemampuan lebih baik dibandingkan dengan dosis 100.000 ppm dan 50.000 ppm dalam menurunkan jumlah mikrokoloni, dan persentase luas area biofilm *S.aureus* namun masih dibawah dari lysorin®.
Kata Kunci: *Alpinia purpurata; 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

THE EFFECTIVENESS OF ETHANOL EXTRACT FROM RED GINGER RHIZOMES *(Alpinia purpurata)* AGAINST *Staphylococcus aureus* ANTIBIOFILM

Annisa Kurniawati, Reza Hakim, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* is a bacterium capable of forming biofilm on abiotic surfaces, starting with adhesion. *Alpinia purpurata* is a plant known for its antibacterial effect and still unexplored potential as antibiofilm agent. This research aims to determine the effect of *A.purpurata* rhizome ethanol extract on the number of microcolonies and the percentage of biofilm area of *S. aureus.*
Method: This research is an in vitro experimental research. The extraction of *Alpinia purpurata* was conducted through the maceration method using 70% ethanol. Biofilm formation involved the inoculation of *S. aureus* on BHI-B + 2% sucrose media, followed by incubation at 37°C for 48 hours. Assessment of the biofilm was perfomed through microscopic analysis using trinocular microscope and use ImageJ application to measure the biofilm area and the number of microcolonies, compared to lysorin® as the positive control. Statistical analysis was performed using One-Way ANOVA, followed by Post Hoc test with significance value $p<0.05$.
Results: EAP showed decreasing S. aureus microcolonies at 50,000 ppm (2,247±65 units), 100,000 ppm (1,929±102 units), and 200,000 ppm (1,491±132 units) compared to the untreated sample (4,299±302 units). Lysorin® proved more potent, reducing microcolonies to 26±14 units. At 200,000 ppm, results were comparable to 70% ethanol (1,612±107 units). Biofilm area percentages at 50,000 ppm (35.48±1.48%), 100,000 ppm (35.19±1.42%), and 200,000 ppm (30.51±1.06%) were similar to 70% ethanol (34.64±2.02%). However, all three concentrations significantly differed from Lysorin®, which achieved a lower biofilm area percentage of (16.27±1.33%), demonstrating Lysorin®'s superior potential in reducing biofilm area.
Conclusion: The ethanol extract of A. purpurata at a concentration of 200,000 ppm demonstrates better efficacy compared to doses of 100,000 ppm and 50,000 ppm in reducing the number of microcolonies and the percentage of S. aureus biofilm area, yet it remains inferior to Lysorin®.
Keywords: *Alpinia purpurata; 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

Penyakit infeksi merupakan masalah yang terus berkembang di bidang kesehatan. Penyakit ini mampu menular dari satu orang ke orang lain, dari hewan ke manusia dan dari lingkungan sekitar manusia.[1] Pada tahun 2010, di Indonesia tercatat bahwa 10 rumah sakit umum mengalami tingkat infeksi nosokomial yang tinggi, yakni antara 6 hingga 16%, dengan rata-rata sekitar 9,8%.[2] Infeksi nosokomial disebabkan kontaminasi bakteri pada peralatan medis oleh beberapa jenis mikroorganisme yaitu: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli,* dan *Candida albicans.*[3,4]

Staphylococcus aureus merupakan bakteri yang umum atau sebagai flora normal pada beberapa area tubuh manusia, termasuk hidung, kulit, tenggorokan, dan mulut. Bakteri *S. aureus* dapat menyebabkan beragam jenis infeksi klinis seperti bakterimia, endokarditis, infeksi pada tulang dan sendi osteoartikular, infeksi kulit dan jaringan lunak, infeksi pada paru-paru dan pleura pleuropulmonal, serta infeksi nosokomial.[5] Faktor virulensi pada awal infeksi oleh *Staphylococcus aureus* adalah adhesi, yang memungkinkan bakteri ini untuk melekat pada permukaan sel inang. Setelah adhesi, bakteri ini kemudian dapat mengkolonisasi area tersebut, memicu pembentukan biofilm, dan menandakan dimulainya patogenesis penyakit. Bakteri yang mempunyai kemampuan yang kuat dalam menempel dan membentuk koloni, juga memiliki sistem pertahanan yang kuat terhadap fagositosis, cenderung lebih virulen daripada bakteri yang umum. Pembentukan biofilm juga menjadi faktor penting dalam mengenali galur bakteri yang bersifat patogen.[6] Salah satu contohnya adalah *Staphylococcus aureus*, yang mampu membentuk biofilm pada berbagai permukaan, terutama pada peralatan medis seperti kateter atau implan.[7]

Biofilm adalah struktur kompleks yang terdiri dari sekumpulan mikroorganisme yang terikat pada permukaan tertentu dan membentuk lingkungan mikro yang terorganisir bagi mikroorganisme tersebut. Diperkirakan bahwa sekitar 65% dari total kasus infeksi nosokomial disebabkan oleh biofilm.[8] Biofilm berperan sebagai taktik bertahan bagi bakteri di lingkungan yang tak menentu, seperti fluktuasi suhu dan perubahan nutrisi yang tidak stabil. Bakteri yang mampu membentuk biofilm dapat menghindari dari sistem kekebalan tubuh inang. dan berpotensi lebih resisten terhadap biosida.[9] Disinfektan merupakan pilihan intervensi utama melawan organisme patogen pada permukaan biotik maupun abiotik.[10] Penggunaan disinfektan yang tepat memiliki peran yang sangat penting dalam upaya pencegahan infeksi nosokomial yang efektif.[11] Pembentukan biofilm dapat dicegah dengan cara menghambat penempelan bakteri pada permukaan abiotik dengan menemukan senyawa antibiofilm dengan memanfaatkan bahan alam dari tanaman herbal.

Lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) adalah salah satunya tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat Peneliti sebelumnya menggunakan metode maserasi dengan etanol 70% untuk mengekstraksi rimpang lengkuas merah.[12] Hasil ekstraksi ini menghasilkan ekstrak kental berwarna merah, dan ekstrak etanol dari rimpang lengkuas tersebut menunjukkan adanya aktivitas antijamur dan antibakteri. Rimpang lengkuas merah memiliki sejumlah bahan aktif yang umumnya digunakan sebagai obat, termasuk alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, tanin, dan terpenoid.[13] Namun, meskipun kandungan ini ada, efektivitasnya sebagai antibiofilm masih perlu diteliti lebih lanjut dan belum diketahui secara pasti.

Oleh karena itu, penelitian ini akan melakukan uji antibiofilm terhadap biofilm matur *S. aureus* menggunakan rimpang lengkuas merah. Uji antibiofilm yang dilakukan dengan metode *microscopic direct observation* dan pengolahan dengan menggunakan aplikasi *ImageJ* untuk menghitung jumlah mikrokoloni bakteri dan persentase luas area biofilm. Harapannya, hasil dari penelitian ini dapat memberikan wawasan baru yang berguna dalam mengatasi masalah biofilm yang terbentuk pada peralatan medis dan mengembangkan strategi yang lebih efektif dalam menghindari pembentukan biofilm yang disebabkan oleh *S. aureus*.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental yang dilakukan bersifat analitik laboratorik untuk mengetahui persentase luas area biofilm serta mengetahui penurunan jumlah mikrokoloni bakteri *Staphylococcus aureus* setelah pemberian ekstrak etanol rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata)*. Simplisia rimpang *Alpinia purpurata* diperoleh dari UPT Materia Medika Batu.Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2023 di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran FK UNISMA dan Laboratorium Biomedik FK UMM.

Pembuatan Ekstrak dan Dosis Etanol Rimpang Lengkuas Merah *(Alpinia purpurata)*

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan simplisia 200 gram simplisia *Alpinia purpurata* direndam dalam 1000 ml etanol 70% selama 6 jam dengan sesekali diaduk, lalu dibiarkan selama 18 jam. Langkah berikutnya adalah menyaring bahan mentah dan kemudian menguapkan pelarut dari filtrat yang dihasilkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 100 rpm. Pada tahap akhir proses ekstraksi ini, diperoleh ekstrak etanol *Alpinia purpurata* berwarna coklat dengan konsistensi kental, yang kemudian digunakan sebagai bahan uji.[14]

Pada penelitian sebelumnya, didapatkan konsentrasi fraksi dari air rimpang lengkuas merah *(alpinia purpurata)* yaitu pada dosis 100.000 ppm memiliki potensi menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus,* tetapi kemampuan dalam mengatasi biofilm masih belum diketahui.[15] Ekstrak etanol rimpang lengkuas merah telah dibuat dibagi menjadi tiga konsentrasi. Ekstrak kental diambil sebanyak 2 gram lalu dilarutkan dengan etanol sebanyak 10 ml sehingga terbentuklah larutan EAP dosis 200.000 ppm. Selanjutnya ambil ½ bagian dari ekstrak tersebut lalu tambahkan etanol sebanyak 5 ml pada larutan sehingga terbentuklah larutan EAP dosis 100.000 ppm. Selanjutnya ambil ½ bagian dari ekstrak tersebut lalu tambahkan etanol sebanyak 5 ml pada larutan sehingga terbentuklah larutan EAP dosis 50.000 ppm.[16]

Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah *(Alpinia purpurata)*

Uji Flavonoid

Sebanyak 1 ml sampel ekstrak rimpang lengkuas merah dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Kemudian, beberapa tetes NaOH 10% ditambahkan ke dalam ekstrak yang telah disaring, diikuti dengan pengocokan selama 1-2 menit. Tahap berikutnya melibatkan penambahan beberapa tetes HCl pekat, yang diikuti dengan penambahan 0,1 gram bubuk Mg. Jika larutan berubah menjadi warna merah, itu menandakan adanya flavonoid.[17]

Uji Fenolik

1 ml sampel ekstrak rimpang lengkuas merah dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian, tambahkan FeCl3 pekat ke dalam tabung. Jika uji fenol positif, akan terbentuk warna biru atau biru ungu/ungu tua pada larutan.[17]

Uji Saponin

Sampel ekstrak rimpang lengkuas merah sebanyak 2 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Campurkan 5 ml air destilasi dan didihkan campuran tersebut selama 2-3 menit. Setelah itu, dinginkan larutan dan kemudian kocok dengan energi yang cukup. Hasil uji positif akan terlihat dengan pembentukan buih atau busa yang stabil.[17]

Uji Terpenoid dan Steroid

Sampel ekstrak rimpang lengkuas merah seberat 4 gram diletakkan di atas plat tetes dan diberi asam asetat anhidrat (Ac2O) hingga meresap ke seluruh sampel, kemudian didiamkan selama sekitar 15 menit. Sejumlah tetes larutan dari sampel tersebut kemudian dipindahkan ke lubang lainnya dan diberi 1-2 tetes H2SO4 pekat. Perubahan warna menjadi merah jingga atau ungu menunjukkan keberadaan terpenoid, sementara perubahan warna menjadi biru atau hijau kebiruan menandakan keberadaan steroid.[17]

Uji Alkoid

Sampel ekstrak rimpang lengkuas merah sebanyak 4 gram diolah dengan kloroform dan dihaluskan. Selanjutnya tambahkan 10 ml kloroform dan 10 ml amoniak 0.05N, sampel kemudian difiltrasi ke dalam tabung reaksi. Dilanjutkan dengan penambahan 10 tetes asam sulfat 2N, pengocokan, dan diamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atasnya kemudian dipindahkan ke tiga tabung reaksi berisi masing-masing 2,5 ml. Reaksi dengan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan berwarna merah jingga.[17]

Uji Tanin

Sejumlah 1 ml ekstrak dari rimpang lengkuas merah dialihkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2-3 tetes larutan FeCl3 5%. Jika larutan berubah warna menjadi hijau atau biru hingga berkecokelatan, itu menandakan keberadaan tanin.[18]

Uji Pembentukan Biofilm

Proses pembentukan biofilm dimulai dari pembuatan media cair *brain-heart infusion broth* (BHIB) 3,7 gram + Sukrosa 2% 2 gram dengan pelarut ddH2O 100 ml yang sudah disterilkan dalam autoklaf. Tuangkan pada cawan petri yang didalamnya berisikan *object glass* steril

sebanyak 5 ml atau sampai permukaan *object glass* sudah tertutupi oleh media. Cawan petri yang sudah berisikan media tersebut selanjutnya ditambahkan 20 µl larutan bakteri *Staphylococcus aureus* yang sudah disesuai dengan standar *McFarland* 0,5% (1,5 × 108CFU/ml), lalu cawan petri dilakukan inkubasi selama 2 hari atau 48 jam pada suhu 37°C.[19]

Uji Antibiofilm

Setelah 48 jam diinkubasi dilakukan pencucian atau pembilasan pada *glass object* dengan natrium klorida 0,9% steril sebanyak dua kali (setiap pembilasan). Tetesi seluruh permukaan *object glass* dengan pewarna *crystal violet* 0,1% dan ditunggu selama 1 menit.[18] Setelah itu, *crystal violet* 0,1% dibuang dan dibilas kembali dengan menggunakan *natrum klorida* 0,9%, lalu tetesi dengan pewarnaan *lactophenol cotton blue* (LPCB) pada seluruh permukaan *object glass* dan didiamkan selama 1 menit. Selanjutnya, dibilas kembali *object glass* dengan *natrum klorida* 0,9%. Setelah itu, *object glass* dilakukan perendaman dengan menggunakan lysorine, akuades, etanol 70%, dan tiga dosis EAP yang telah dibuat sebelumnya dengan konsentrasi 50.000 ppm, 100.000 ppm dan 200.000 ppm.[20,21]

Perendaman tersebut dilakukan selama 5 menit, kemudian dibilas kembali dengan *natrum klorida* 0,9%. Setelah dibilas, tetesi dengan LPCB selama 1 menit. Langkah selanjutnya yaitu memindahkan *object glass* dengan pinset steril untuk dikeringkan dan simpan pada suhu ruangan. Setelah permukaan *object glass* kering, dilakukan pengamatan pada *object glass* dengan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop trinokuler untuk melihat jumlah mikrokoloni *Staphylococcus aureus* dan luas area plak biofilm pada permukaan *object glass*, lalu dokumentasikan hasil pengamatan tersebut. Selanjutnya dilakukan perhitungan mikrokoloni dan persentasi luas area biofilm dengan metode *Direct Microscopic Observation* yang dibantu dengan menggunakan aplikasi *ImageJ.*[22]

Analisa Data dan Statistik

Uji statistik melibatkan pemeriksaan data untuk normalitas dan homogenitas. Jika data menunjukkan kriteria normal dan homogen, maka dilakukan uji *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) serta diikuti dengan analisis post-hoc. Namun, jika data tidak terdistribusi secara normal dan tidak homogen ($p<0.05$), maka uji non-parametrik akan dilakukan menggunakan *Krusskal Wallis.*

HASIL PENELITIAN

Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah *(Alpinia purpurata)*

Pada penelitian ini hasil uji fitokimia ekstrak etanol rimpang lengkuas merah *(Alpinia purpurata)* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, terpenoid, steroid dan tannin. (**Tabel 1**).

Tabel 1. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah *(Alpinia purpurata)*

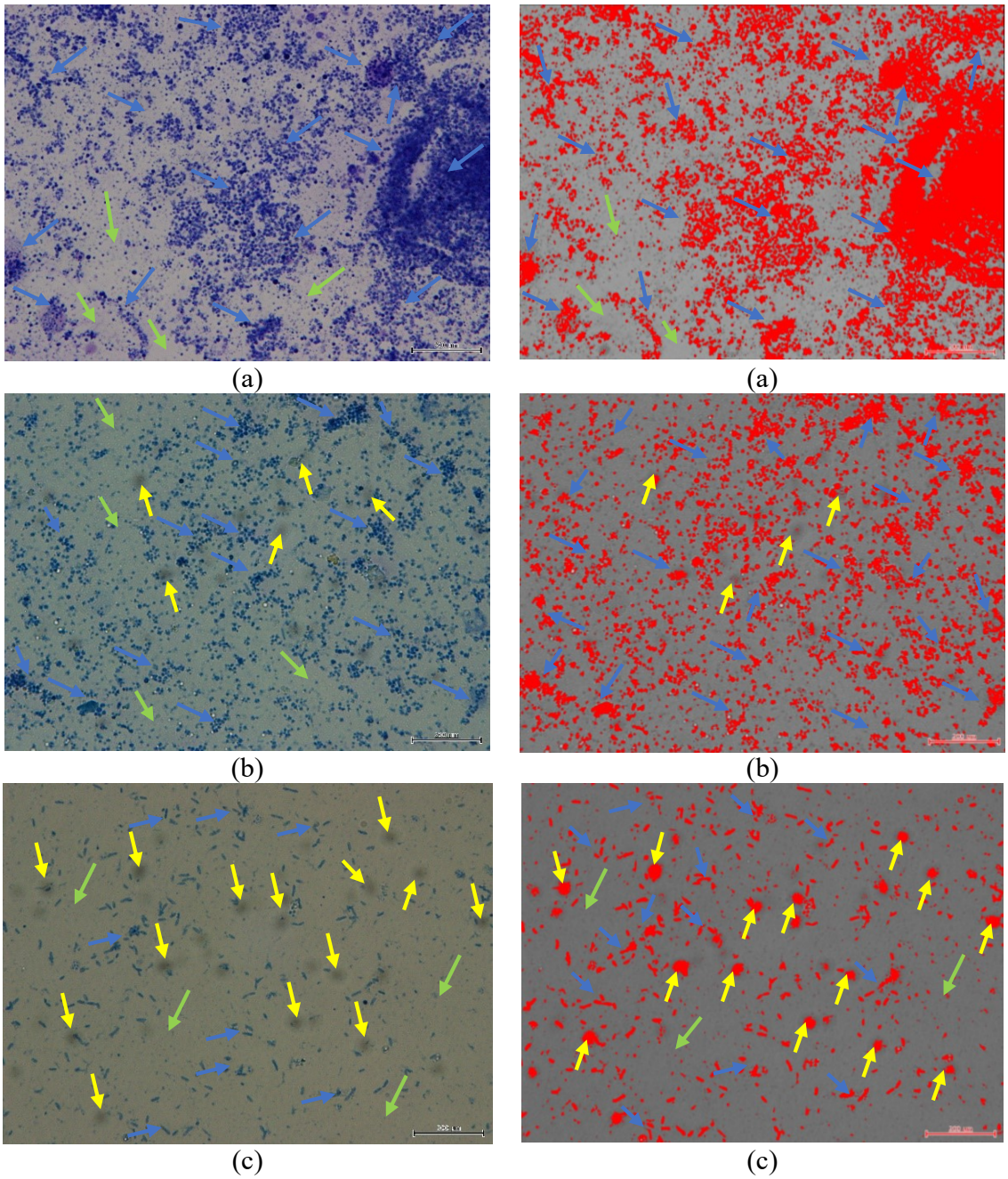
Golongan Senyawa	Perubahan Warna	Kesimpulan
Alkaloid	Endapan kemerahan/jingga	+
Flavonoid	Warna merah atau jingga	+
Fenolik	Warna biru atau keunguan	+
Saponin	Terbentuknya buih/busa yang stabil	+
Terpenoid	Warna merah atau keunguan	+
Steroid	Warna biru atau hijau kebiruan	+
Tanin	Warna biru atau kehitaman	+

Keterangan: + menandakan adanya senyawa aktif.

Perhitungan Jumlah Mikrokoloni *Staphylococcus aureus*

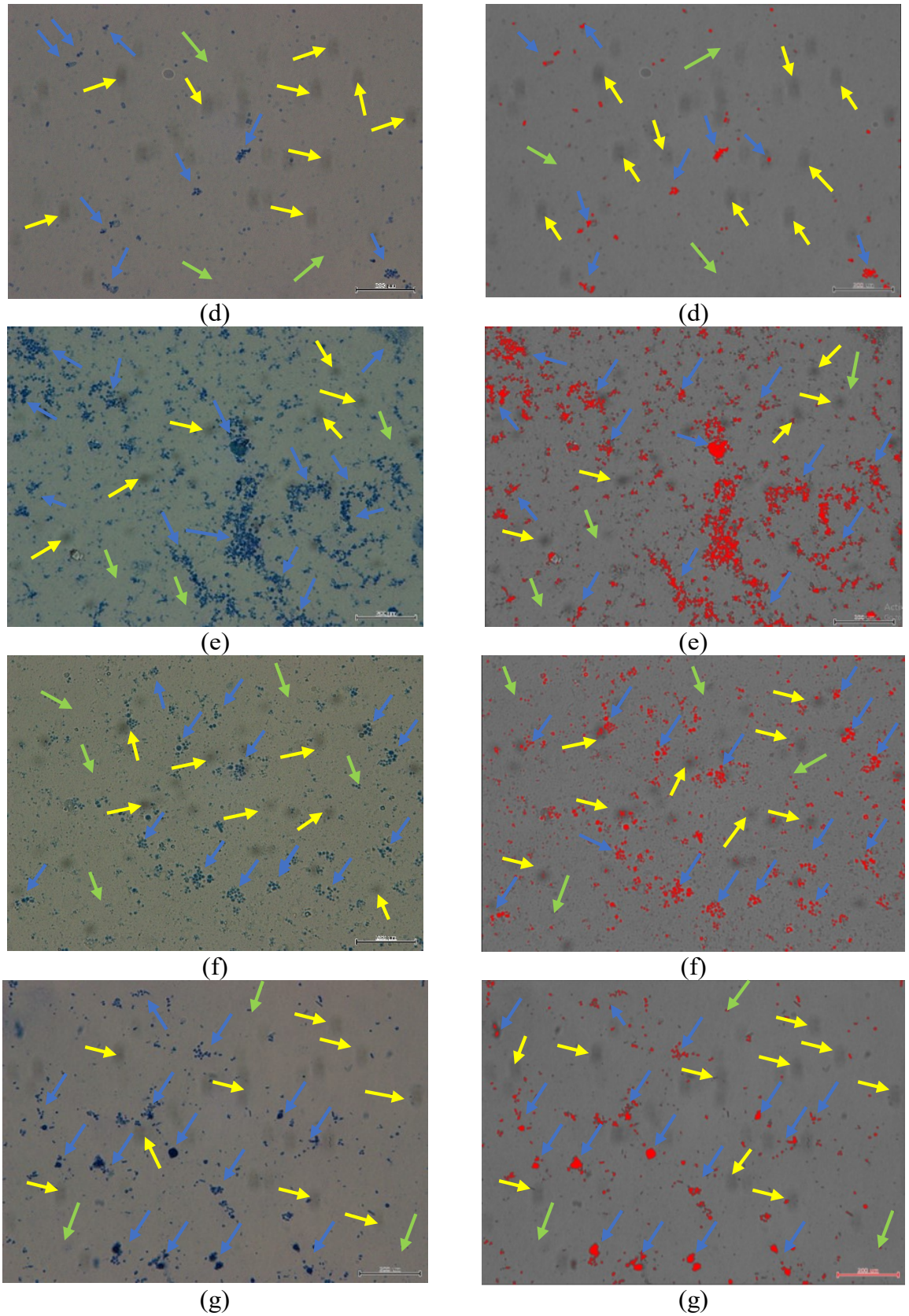
Hasil pengamatan *object glass* pada perhitungan jumlah mikrokoloni dengan menggunakan aplikasi *ImageJ* dapat dilihat pada **Gambar 1, 2 dan 3.**

Penghitungan jumlah mikrokoloni didapatkan pada masing-masing perlakuan yakni, pada *object glass* sebelum pencucian atau tanpa perlakuan adalah 4.299±302 *Unit* dan setelah pencucian menggunakan akuades sebesar 3.845±229 *Unit*. *Object glass* yang diberikan etanol 70% sebesar 1.612±107 *Unit* dan lysorin® adalah 26±14 *Unit.* Sementara itu, pada EAP dosis 50.000ppm adalah 2.247±65 *Unit,* EAP dosis 100.000ppm adalah 1.929±102 *Unit* dan EAP dosis 200.000 ppm sebesar 1.491±132 *Unit.*



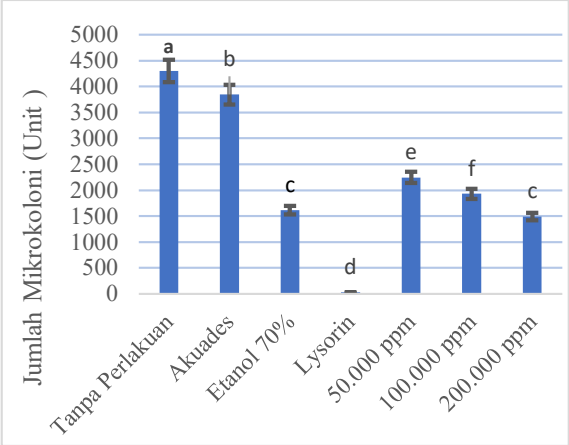
Gambar 1. Hasil Uji Antibiofilm Berdasarkan Jumlah Mikrokoloni *S. aureus*

Keterangan: Hasil pengamatan berdasarkan jumlah mikrokoloni pada perbesaran 1000x dengan menggunakaan mikroskop trinokuler, dan dilakukan perhitungan jumlah mikrokoloni menggunakan aplikasi *ImageJ* terhadap *object glass* kontrol negatif dan perancu. Tanda panah berwarna biru menunjukkan adanya mikrokoloni yang terdeteksi, panah berwarna kuning menunjukkan debris, dan panah berwana hijau merupakan daerah yang tidak terdeteksi adanya mikrokoloni. (a): Tanpa perlakuan; (b): Akuades; (c): Etanol.



Gambar 2. Hasil Uji Antibiofilm Berdasarkan Jumlah Mikrokoloni *S. aureus*

Keterangan: Hasil perhitungan jumlah mikrokoloni menggunakan aplikasi *ImageJ* terhadap *object glass* kontrol positif dan ekstrak *A.purpurata*. Tanda panah berwarna biru menunjukkan adanya mikrokoloni yang terdeteksi, panah berwarna kuning menunjukkan debris, dan panah hijau yakni daerah yang tidak terdeteksi adanya mikrokoloni. (d): Lysorin®; (e): EAP dosis 50.000 ppm; (f): EAP dosis 100.000ppm; (g): EAP dosis 200.000 ppm.



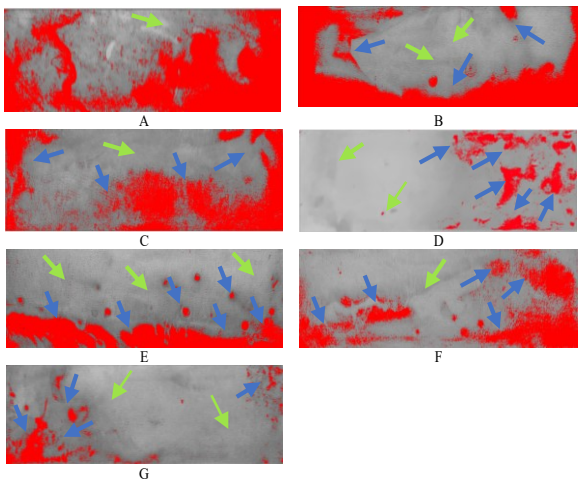
Gambar 3. Histogram Perhitungan Jumlah Mikrokoloni Ekstrak Etanol *Alpinia purpurata*

Keterangan: (a, b, c, d, e, f) pada histogram diatas menunjukkan perbedaan efek uji antibiofilm (p<0,05, Uji LSD). Pada huruf yang sama (c) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan secara signifikan, antara etanol 70% dengan EAP dosis 200.000 ppm.

Pengukuran Persentase Luas Area Biofilm *Staphylococcus aureus*

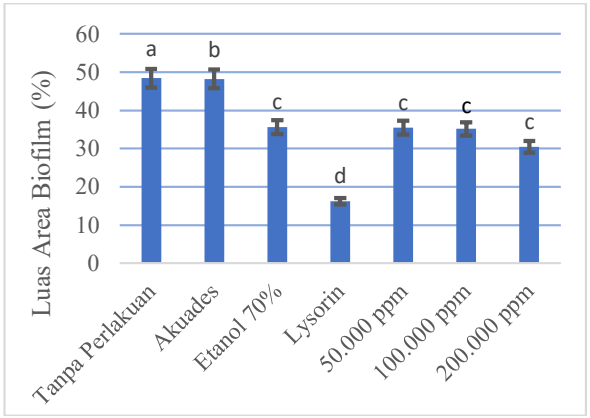
Hasil pengukuran persentase luas area biofilm *S.aureus* pada uji antibiofilm EAP dengan menggunakan aplikasi *ImageJ* dapat dilihat pada **Gambar 3** dan **Gambar 4**.

Pengukuran persentase luas area biofilm didapatkan pada masing-masing perlakuan. Pada *object glass* sebelum pencucian atau tanpa perlakuan adalah 48,43±5,29% dan setelah pencucian menggunakan akuades sebesar 48,26±2,27%. *Object glass* yang diberikan Etanol 70% sebesar 34,64±2,02% dan lysorin® adalah 16,27±1,33%. Sementara itu, pada EAP dosis 50.000ppm adalah 35,48±1,48%, EAP dosis 100.000ppm adalah 35,19±1,42% dan EAP dosis 200.000 ppm sebesar 30,51±1,06%.



Gambar 4. Hasil Uji Antibiofilm Berdasarkan Persentase Luas Area Biofilm

Keterangan: Tanda panah berwarna biru menunjukkan bahwa adanya biofilm yang terdeteksi oleh *ImageJ* dan panah berwarna hijau menunjukkan area yang tidak terdapat biofilm. (A): Tanpa perlakuan; (B): Akuades; (C): Etanol; (D): Lysorin®; (E): EAP dosis 50.000 ppm; (F): EAP dosis 100.000 ppm; (G): EAP dosis 200.000 ppm.



Gambar 5. Histogram Pengukuran Persentase Luas Area Biofilm Ekstrak Etanol *Alpinia purpurata*

Keterangan: (a, b, c, dan d) pada histogram diatas menunjukkan perbedaan efek uji antibiofilm (p<0,05, Uji *LSD*). Pada huruf yang sama (c) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan secara signifikan, antara etanol 70% dengan ketiga dosis EAP (50.000 ppm, 100.000 ppm, 200.000 ppm).

PEMBAHASAN

Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah *(Alpinia purpurata)*

Pada penelitian ini, ekstrak etanol rimpang lengkuas merah (Alpinia purpurata) mengandung berbagai metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, fenolik, saponin, tannin, steroid, dan terpenoid. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, dipilih karena kemampuannya menembus membran sel, memfasilitasi difusi sel, dan menarik senyawa bioaktif secara lebih efisien.[23]

Hasil uji fitokimia dalam penelitian ini sejalan dengan penemuan sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% dari rimpang lengkuas merah mengandung flavonoid, saponin, fenolik dan tanin.[24] Di samping itu, ekstrak tersebut juga teridentifikasi mengandung senyawa lain seperti flavonoid, saponin, terpenoid, steroid, dan fenolik.[12] Kemiripan hasil uji fitokomia pada keduanya karena penggunaan metode ekstraksi yang serupa sehingga mampu menghasilkan kandungan senyawa yang sama.

Uji Antibiofilm Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah *(Alpinia purpurata)* terhadap Jumlah Mikrokoloni *Staphylococcus aures*

Hasil uji antibiofilm berdasarkan jumlah mikrokoloni *S.aureus* terdapat penurunan secara signifikan ($p \leq 0.05$) antara EAP dosis 50.000 ppm, 100.000 ppm, dan 200.000 ppm dibandingkan tanpa perlakuan dan akuades. Akuades dapat membantu melonggarkan biofilm atau membantu membersihkan permukaan yang terkena biofilm, tetapi pengaruhnya mungkin terbatas pada mekanisme pembersihan fisik.[25] Pada EAP dosis 200.000 ppm tidak terdapat perbedaan secara signifikan dibandingkan etanol 70%, namun masih rendah dari lysorin. Sedangkan pada konsentrasi 50.000 ppm dan 100.000 ppm lebih tinggi dibandingkan etanol 70%. Hal ini diduga karena etanol 70% juga bersifat sebagai agen antibakteri dengan melibatkan kerusakan pada struktur mikroorganisme, termasuk mikrokoloni bakteri. Cara kerja etanol 70% terhadap mikrokoloni adalah dengan menembus membran sel dan mengganggu permeabilitas sel yang mengakibatkan kebocoran sel serta mengganggu struktur protein, sehingga menyebabkan kerusakan yang signifikan pada mikrokoloni.[26]

Pada penelitian ini, lysorin® mempunyai potensi lebih efektif dalam menurunkan jumlah mikrokoloni *S.aureus* dengan menunjukkan adanya penurunan jumlah mikrokoloni hingga tersisa sebanyak 26±14 *Unit*. Lysorin® yang digunakan sebagai disinfektan mengandung zat aktif seperti senyawa klorin dan fenol yang memiliki sifat antimikroba dan antibiofilm. Pada penelitian ini dosis Lysorin® yang digunakan adalah dosis maksimal yakni kadar 100%, sehingga memiliki efektivitas pembersihan mikroba yang maksimal. Hal ini terlihat dari penurunan area biofilm sebesar >90%, yang dapat mengganggu adhesi mikroorganisme pada permukaan, menghambat pembentukan matriks biofilm, merusak sel dalam struktur biofilm.[10]

Dari data hasil, bahwa EAP dengan dosis 200.00 ppm memiliki kemampuan lebih baik dalam menurunkan jumlah mikrokoloni dibandingkan dosisi lainnya. Hal ini disebabkan karena semakin meningkat konsentrasi sampel uji maka akan semakin tinggi aktivitasnya sesuai dengan teori *concentration dependent* semakin tinggi dosis maka semakin kuat daya kerjanya.[27] Ekstrak *A.purpurata* mengandung berbagai senyawa seperti alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, steroid, fenolik dan tanin. Senyawa tanin dan flavonoid menghambat pertumbuhan biofilm dengan menghambat ekspresi gen icaA dan icaD, yang mengatur sintesis *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA), penting dalam agregasi sel dan pembentukan EPS pada *S. aureus*.[28,29] Senyawa fenolik menghambat *quorum sensing,* mengurangi adhesi, dan menghambat ekspresi faktor virulensi, sehingga menghambat sintesis EPS.[30] Alkaloid, dengan bagian dasar nitrogennya, berinteraksi dengan senyawa asam amino, berperan dalam pembentukan dinding sel, dan juga terlibat dalam DNA bakteri. Melalui interaksi ini, struktur DNA dapat terpengaruh dan menyebabkan ketidakseimbangan genetik pada rantai DNA, yang akhirnya dapat menyebabkan kerusakan pada DNA, pemecahan sel bakteri, dan pada akhirnya menyebabkan kematian sel. Di sisi lain, steroid mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan menghalangi produksi protein, dan juga memiliki kemampuan untuk merangsang perubahan pada komponen-komponen sel bakteri.[28]

Terpenoid bertindak sebagai antibiofilm dengan menghambat pembentukan biofilm melalui penghambatan sintesis EPS melalui gangguan pada ekspresi selulosa.[31] Saponin berfungsi sebagai agen antibiofilm dengan meningkatkan permeabilitas membran bakteri, mencegah perlekatan bakteri, dan menghambat serta menghancurkan pembentukan biofilm.[32] Senyawa-senyawa aktif tersebut memiliki potensi aktivitas antimikroba dan kemampuannya dalam mengganggu pembentukan serta mengurangi biofilm mikroorganisme dan juga dari beberapa penelitian menyatakan bahwa kemampuannya sebagai antibiofilm belum diketahui.[33,34] Namun, hasil dari penelitian ini menyatakan bahwa ekstrak *A.purpurata* tidak menunjukkan kemampuan dalam penghancuran biofilm dan menurunkan jumlah mikrokoloni.

Metode penggunaan aplikasi *ImageJ* dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel. Biofilm memiliki beragam struktur ukuran yang dimulai dari fase awal atau sel tunggal, dimana mikroorganisme menempel pada permukaan dengan ukuran <5 μm. Kemudian, terbentuklah kluster dengan ukuran 5-50 μm dari terbentuk dari kelompok kecil sel yang terikat bersama, dan kemudian berkembang menjadi agregat ukuran 50-300 μm yang terdiri dari sejumlah besar sel yang saling terikat. Tahap terakhir adalah mikrokoloni dengan ukuran >300 μm, kumpulan besar sel yang terorganisir dan memiliki koordinasi yang lebih kompleks dalam biofilm.[35] Penelitian ini menggunakan ukuran >200 *pixel*, hal ini memungkinkan bahwa

terdeteksinya semua bentuk struktur biofilm namun tidak dapat dibedakan. Namun, pada struktur biofilm yang paling kecil atau *single cell* tidak ikut terhitung oleh *ImageJ*.

Hasil uji antibiofilm berdasarkan jumlah mikrokoloni, dimana EAP dengan dosis 200.000 ppm tidak mengalami penurunan secara signifikan dibandingkan etanol 70%. Kemungkinan, ini terjadi karena biofilm struktur besar terdapat pada etanol 70% sehingga angkanya akan lebih sedikit dibandingkan jika pada EAP 200.000 ppm terdapat biofilm struktur yang lebih kecil tetapi jumlahnya banyak atau menyebar sehingga membuat jumlah angkanya lebih tinggi. Maka dari penelitian ini dibutuhkan penelitian lanjutan mengenai pengukuran struktur biofilm untuk mengetahui bentuk serta ukuran dari struktur biofilm agar tidak hanya berfokus terhadap jumlah mikrokoloni.

Uji Antibiofilm Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Merah *(Alpinia purpurata)* terhadap Presentase Luas Area Biofilm *Staphylococcus aures*

Hasil uji antibiofilm pada pengukuran persentase luas area biofilm menunjukkan bahwa ekstrak *Alpinia purpurata* dosis 50.000 ppm, 100.000 ppm, dan 200.000 ppm memiliki perbedaan secara signifikan dibandingkan tanpa perlakuan dan akuades, tetapi tidak berbeda secara signifikan dengan etanol 70%. Seperti yang disebutkan sebelumnya, etanol 70% juga bersifat sebagai agen antibakteri dengan melibatkan kerusakan pada struktur sel bakteri, sehingga hal tersebut mempengaruhi dari persentase luas area biofilm. Sementara itu, lysorin® sebagai kontrol positif memiliki potensi lebih efektif dalam mengurangi persentase luas area biofilm karena adanya kandungan klorin dan fenol yang mampu merusak sel bakteri dan EPS pada biofilm.[10]

Hasil dari penelitian menyatakan bahwa ketiga dosis EAP tidak menunjukkan kemampuan yang cukup baik dalam menghancurkan plak biofilm serta mengurangi persentase luas area biofilm. Hal ini ditunjukkan tidak berbedanya kemampuan ekstrak *Alpinia purpurata* dibandingkan dengan etanol 70% dalam pengurangan persentase luas area biofilm.

KESIMPULAN

1. Ekstrak etanol rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) dapat menurunkan jumlah mikrokoloni bakteri *S.aureus* namun masih dibawah Lysorin®.
2. Ekstrak etanol rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) dapat mengurangi persentase luas area biofilm *S.aureus* namun masih dibawah Lysorin®.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam terkait penggunaan ImageJ untuk penghitungan serta pengukuran struktur biofilm dalam membedakan struktur besar dengan struktur kecil.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengukuran luas area biofilm dengan menambahkan perbandingan luas total area seluruhnya.
3. Perlu dilakukan memilah antara mikrokoloni dan debris agar tidak ikut terdetaksi sebagai mikrokoloni, sehingga tidak mempengaruhi perhitungan jumlah mikrokoloni maupun luas area biofilm.
4. Penggunaan Lysorin® dengan kadar 0.5% sebagai disinfektan alat kesehatan. Maka dari itu, perlu dilakukannya pengenceran Lysorin®.
5. Perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam terkait aktivitas dari fraksi etanol rimpang lengkuas merah *(Alpinia purpurata)* dalam menghancurkan *biofilm S. aureus*.
6. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk menguji secara lebih mendalam kadar senyawa metabolit sekunder dalam rimpang lengkuas merah (Alpinia purpurata) menggunakan metode uji fitokimia kuantitatif.

UCAPAN TERIMAKASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

1. Merta, I., Nuidja, I., & Marwati, N. (2013). Ekstrak Gambir Memiliki Daya Hambat Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus secara in vitro. *Jurnal Skala Husada*, *10*(1): 39–43.
2. Zakaria, A. A., & Sofiana, L. (2018). Correlation Between Nurse Knowledge and Attitude With Hand Hygiene Compliance. *Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Indonesia*, *9*(2): 74–81. https://doi.org/10.20885/jkki.vol9.iss2.art3
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 Dental Journal*, *7*(3): 125–127.
4. Rahman, I. W., Arfani, N., Rafika, & Tadoda, J. V. (2023). Deteksi Bakteri MRSA Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus pada Sampel Darah Pasien Rawat Inap. *Jurnal Ilmu Alam Dan Lingkungan*, *14*(1): 48–54
5. Utami, P. S. M., Noorhamdani, & Rahayu, M. (2020). Biofilm Staphylococcus aureus secara In Vitro The Effect of Basil Leaves Ethanol Extract (Ocimum sanctum) in Inhibiting The Establishment of Staphylococcus aureus biofilms with In Vitro Method. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences, 6*(3): 168–173.
6. Dewi, M., Darmawi, Nurliana, Karmil, T. F., Helmi, T. Z., Fakhrurrazi, Erina, Abrar, M., Daud, M., & Admi, M. (2020). Aktivitas Antibiotik terhadap Biofilm Staphylococcus aureus Isolat Preputium Sapi Aceh. *Jurnal Sain Veteriner, 38*(1), 1–6. https://doi.org/10.22146/jvs.35219
7. Zhang, K., Li, X., Yu, C., & Wang, Y. (2020). Promising Therapeutic Strategies Against Microbial Biofilm Challenges. *Jurnal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10*(1): 1–16. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00359
8. Assefa, M., & Amare, A. (2022). Biofilm-Associated Multi-Drug Resistance in Hospital-Acquired Infections : *A Review. Dovepress Scientific and Medical Research, 15*: 5061–5068.
9. Setiawan, F., Wahjuningrum, Agustin, D., Yudianto, Ahmad, Radhianto, Eta, Sunariani, Jenny, Bhardwaj, & Bhardwaj, A. (2021). The Inhibition Effect of Capsaicin Extract Against Staphylococcus aureus : An In Vitro Experimental Study. *Journal of International Oral Health, 13*(4): 393–399. https://doi.org/10.4103/jioh.jioh
10. 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
11. Block, S. S., 1983, *Disinfection, Sterilization, and Preservation,* 3th ed, Lea & Febiger, Philadelphia, 470-471.
12. Yuliani, N., Syawaalz, A., & Lisna, M. (2011). Senyawa Fenol dari Rimpang Lengkuas Merah (Alpinia purpurata (Vieill) K . Sch). *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa, 1*(2): 111–118.
13. Sangadji, T., Elyb, I. P., & Husain, W. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas (Alphinia purpurata k. Schum) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Escherichia coli dengan Menggunakan Metode Difusi Sumuran. *Jurnal Rumpun Ilmu Kesehatan, 1*(3): 45–54.
14. Supriningrum, R., Fatimah, N., & Purwanti, Y. E. (2019). Karakterisasi Spesifik dan Non Spesifik Ekstrak Etanol Daun Putat (Planchonia valida). *Al Ulum Sains Dan Teknologi, 5*(1): 6–12.
15. Mas'uliyah, N. U., Aini, F. N., & Risandiansyah, R. (2023). Perbandingan Ekstrak Kasar Dengan Fraksi Ekstrak Metanol Rimpang Lengkuas Merah (Alpinia Purpurata K. Schum) Sebagai Antibakteri. *1*(1), 1–10.
16. Saridewi, M. N., Bahar, M., & Anisah. (2018). Uji Efektivitas Antibakteri Perasan Jus Buah Nanas (Ananas comosus) Terhadap Pertumbuhan Isolat Bakteri Plak Gigi di Puskesmas Kecamatan Tanah Abang Periode April 2017. *Biogenesis Jurnal Ilmiah Biologi, 5*(2): 104–110. https://doi.org/10.24252/bio.v5i2.3532
17. Sangi, M., Runtuwene, M. R. J., Simbala, H. E. I., & Makang, V. M. A. (2008). Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat Di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry Progress, 1*(1): 47–53.
18. Yanti, Nastiti, K., & Mambang. (2020). Uji Farmakognostik dan Identifikasi Senyawa Pada Beberapa Tingkatan Fraksi Ekstrak Etanol Daun Lengkuas (Alpinia galanga). *Journal of Pharmaceutical Care and Science, 1*(1): 102–110.
19. Masrukhin, Setiawan, R., Kusmiati, M., & Saputra, S. (2021). Optimasi Pembentukan Biofilm Staphylococcus aureus dan Pseudomonas aeruginosa Melalui Penambahan Glukosa dan NaCl. *Journal Uin Alauddin, 1*(1): 342–347.
20. 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

21. Saridewi, M. N., Bahar, M., & Anisah. (2018). Uji Efektivitas Antibakteri Perasan Jus Buah Nanas (Ananas comosus) Terhadap Pertumbuhan Isolat Bakteri Plak Gigi di Puskesmas Kecamatan Tanah Abang Periode April 2017. *Biogenesis Jurnal Ilmiah Biologi, 5*(2): 104–110. https://doi.org/10.24252/bio.v5i2.3532
22. Kurniawan, C., Waluyo, T. B., & Sebayang, P. (2011). Analisis Ukuran Partikel Menggunakan Free-Software Image-J. Seminar Nasional Fisika Pusat Penelitian Fisika-LIPI.
23. Yulianti, W., Gilang Ayuningtiyas, Martini, R., & Resmeiliana, I. (2020). Pengaruh Metode Ekstraksi dan Polaritas Pelarut Terhadap Kadar Fenolik Total Daun Kersen (Muntingia calabura L). *Jurnal Sains Terapan, 10*(2): 41–49.
24. Padmasari, P. D., Astuti, K. W., & Warditiani, N. K. (2013). Skrining fitokimia ekstrak etanol 70% rimpang bangle (Zingiber purpureum Roxb.) *Jurnal Sains Terapan, 1* (366): 1–7.
25. Khotimah, H., Anggraeni, E. W., & Setianingsih, A. (2017). Karakterisasi Hasil Pengolahan Air Menggunakan Alat Destilasi Characterization Of Water Processing Using Distilation Equipment. *Jurnal Chemurgy*, *01*(2), 34–38.
26. Asngad, A., R, A. B., & Nopitasari. (2018). Kualitas Gel Pembersih Tangan (Handsanitizer) dari Ekstrak Batang Pisang dengan Penambahan Alkohol, Triklosan dan Gliserin yang Berbeda Dosisnya. *Bioeksperimen, 4*(2), 61–70. https://doi.org/10.23917/bioeksperimen.v4i1.2795
27. Katzung B G. *Basic Clinical Pharmacology. 14th Ed.* North America: Mc Graw Education. 2018. P. 2-8, 642-643
28. Kining, E. jayanti, Falah, S., & Nurhidayat, N. (2016). The In Vitro Antibiofilm Activity of Water Leaf Extract of Papaya (Carica papaya L .) against Pseudomonas aeruginosa. *Current Biochemistry, 2*(3): 150–163.
29. 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. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research, 1,* 56–70. https://doi.org/10.20961/jpscr.v7i1.43698
30. Takó, M., Papp, T., Kerekes, E. B., Kotogán, C. Z. A., Krisch, J., & Vágvölgyi, C. (2020). Plant Phenolics and Phenolic-Enriched Extracts as Antimicrobial Agents against Food-Contaminating Microorganisms. MDPI Antioxidants, 9(165): 1–21. https://doi.org/10.3390/antiox9020165
31. Palomares Navarro, J. J., Bernal Mercado, A. T., González Aguilar, G. A., Ortega Ramirez, L. A., Martínez Téllez, M. A., & Ayala Zavala, J. F. (2023). Antibiofilm Action of Plant Terpenes in Salmonella Strains: Potential Inhibitors of the Synthesis of Extracellular Polymeric Substances. MDPI PATHOGENS, 12(35): 1–17. https://doi.org/https://doi.org/10.3390/pathogens12010035
32. Cankaya, I. I. T., & Somuncuoglu, E. I. (2021). Potential and Prophylactic Use of Plants Containing Saponin-Type Compounds as Antibiofilm Agents against Respiratory Tract Infections. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2021/6814215
33. Nopitasari, D., Fachriyah, E., & Wibawa, P. J. (2017). Triterpenoid dan Nanopartikel Ekstrak n-Heksana dari Rimpang Lengkuas Merah (Alpinia purpurata (Vieill.) K. Schum) serta Uji Sitotoksisitas dengan BSLT. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi, 20*(3): 117–122. https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.117-122
34. Pertiwi, D., Khotimah, S., & Wardoyo, E. R. P. (2023). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Metanol, Etil Asetat, dan N-Heksana Rimpang Lengkuas Merah (Alpinia purpurata, K. Schum) terhadap Bakteri Propionibacterium acnes. *Jurnal Protobiont, 12*(1), 1–8.
35. Paula, A. J., Hwang, G., & Koo, H. (2020). Dynamics of bacterial population growth in biofilms resemble spatial and structural aspects of urbanization. *Nature Communications*, *11*(1354), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41467-020-15165-4