

POTENSI FRAKSI N-HEKSANA DAUN MENIRAN (*Phyllanthus niruri* L.) TERHADAP BIOFILM *Staphylococcus aureus*

Iqlima Dzakiyah, Citra Destya Rahma Putri, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: *Catheter-Associated Urinary tract infections* (CAUTI) merupakan infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh patogen bakteri yang berkolonisasi dan dapat membentuk biofilm salah satunya *Staphylococcus aureus*. Biofilm dapat menghambat efektivitas antibiotik sehingga diperlukan agen antibiofilm baru. Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) mengandung senyawa aktif dalam fraksi n-heksana seperti flavonoid, tanin, dan terpenoid yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri terhadap spektrum luas bakteri Gram-positif. Namun, senyawa ini yang berperan sebagai antibiofilm belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi fraksi n-Heksana daun meniran sebagai agen antibiofilm.

Metode: Penelitian ini termasuk jenis studi eksperimental menggunakan desain *in vitro*. Langkah dilakukan seperti ekstraksi maserasi, fraksinasi dan uji fitokimia kualitatif, serta uji penghambatan dan penghancuran biofilm *Staphylococcus aureus* klinis pada 96 well plate. Uji hambatan dilakukan sebelum biofilm terbentuk dan uji penghancuran pada saat bakteri diberi perlakuan ekstrak setelah pertumbuhan ke jam 48. Dosis yang diuji adalah 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm. Dilakukan sebanyak 5 kali ulangan pada hari yang berbeda.

Hasil: Fraksi n-Heksana meniran memiliki senyawa flavonoid, tanin dan terpenoid. Persentase hambatan dengan dosis 500 ppm 50% dan 1000 ppm 67% memiliki aktivitas sebagai penghambat biofilm. Sedangkan pada uji penghancuran setelah diberi perlakuan tidak ada yang memiliki perbedaan pada setiap dosis.

Kesimpulan: Fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dapat menghambat pertumbuhan biofilm dengan menggunakan dosis 500 ppm dan 1000 ppm dan pada penghancuran yang memiliki kemampuan yaitu DMSO 3%.

Kata kunci: *Catheter-Associated Urinary tract infections* (CAUTI); Biofilm; *Staphylococcus aureus*; *Phyllanthus niruri* L.; Terpenoid; Penghambatan; Penghancuran.

*Penulis Korespondensi:

Rio Risandiansyah, S.Ked., MP., PhD

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

Email: Riorisandiansyah@unisma.ac.id

POTENTIAL OF N-HEXTAN FRACTION OF MENIRAN LEAVES (*Phyllanthus niruri* L.) AGAINST BIOFILM OF *Staphylococcus aureus*

Iqlima Dzakiyah, Citra Destya Rahma Putri, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: *Catheter-Associated Urinary tract infections* (CAUTI) are urinary tract infections caused by bacterial pathogens that colonize and can form biofilms, including *Staphylococcus aureus*. Biofilms can inhibit the effectiveness of antibiotics so that new antibiofilm agents are needed. Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) contains active compounds in the n-hexane fraction such as flavonoids, tannins, and terpenoids that can inhibit bacterial growth against a broad spectrum of Gram-positive bacteria. However, these compounds that act as antibiofilms are not yet known. This study aims to determine the potential of the n-hexane fraction of meniran leaves as an antibiofilm agent.

Methods: This study was an experimental study using *in vitro* design. Steps were carried out such as maceration extraction, fractionation and qualitative phytochemical tests, as well as inhibition and destruction tests of clinical *Staphylococcus aureus* biofilms on 96 well plates. The inhibition test was conducted before biofilm formation and the destruction test when the bacteria were treated with the extract after 24 hours of growth. The doses tested were 62.5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, and 1000 ppm. Performed as many as 5 replicates on different days

Results: The n-Hexane fraction of meniran has flavonoid, tannin and terpenoid compounds. The percentage of inhibition with a dose of 500 ppm 50% and 1000 ppm 67% has activity as a biofilm inhibitor. While the destruction test after being treated has no difference in each dose.

Conclusion: The n-Hexane fraction of meniran leaves (*Phyllanthus niruri* L.) can inhibit biofilm growth by using doses of 500 ppm and 1000 ppm and in the destruction that has the ability is 3% DMSO.

Keywords: *Catheter-Associated Urinary tract infections* (CAUTI); Biofilm; *Staphylococcus aureus*; *Phyllanthus niruri* L.; Terpenoids; Inhibition; Destruction.

*Corresponding Author:

Rio Risandiansyah, S.Ked., MP, PhD

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144

Email: Riorisandiansyah@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Catheter-Associated Urinary Tract Infection (CAUTI) merupakan infeksi saluran kemih yang terjadi akibat penggunaan kateter yang paling umum terjadi yaitu 60% pada pasien yang dirawat di rumah sakit di seluruh eropa. CAUTI dapat ditegakkan dengan kriteria kateter urin yang sudah terpasang lebih dari atau sama dengan 48 jam, dengan gejala seperti demam, nyeri suprapubik dan nyeri pada sudut costovertebra, dan hasil pemeriksaan kultur urin didapatkan hasil positif ≥ 105 CFU/ml dengan 1 atau 2 jenis mikroorganisme dan leukosit esterase positif dengan carik celup (*dipstick*)^[1]. CAUTI dimulai dengan adanya patogen bakteri, diikuti dengan kolonisasi bakteri pada kateter urin, yang menyebabkan pembentukan biofilm. Penyebab utama CAUTI adalah kolonisasi patogen yang paling umum terkait yaitu *Staphylococcus aureus*^[2]. Kemampuan *Staphylococcus aureus* untuk membentuk biofilm pada alat medis yang diimplantasikan atau jaringan inang yang rusak juga merupakan faktor virulensi utama pada patogen ini, terutama pada lingkungan perawatan kesehatan di mana penggunaan antibiotik tinggi dan pembentukan biofilm semacam itu merupakan cara mekanisme bertahan hidup bagi bakteri^[3].

Biofilm adalah sekumpulan mikroorganisme yang menempel pada permukaan baik biotik maupun antibiotik yang tertanam dalam matriks polimer ekstraseluler. Pembentukan biofilm memiliki beberapa tahapan yaitu adhesi, agregasi, pematangan, dan disperse^[4]. Pada tahap adhesi, sel-sel planktonik menempel di permukaan dan berkembang menjadi agregasi yang saling menempel sehingga disebut mikrokoloni^[5]. Kemudian bakteri terus berkembang biak dan menebal membentuk biofilm. Biofilm yang terbentuk akan memberikan resistensi terhadap sistem imun manusia^[6]. Setelah biofilm matur, hal tersebut akan menyebabkan kegagalan dan meningkatkan risiko CAUTI pada pasien, karena biofilm yang matang, akan memulai penyebrannya sehingga dapat mengakibatkan infeksi sistemik, terutama pada pasien yang memiliki sistem kekebalan tubuh yang lemah^[7]. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan terapi baru dikarenakan adanya resistensi.

Indonesia merupakan negara yang kaya akan keanekaragaman hayati yang sebagian besar memiliki khasiat sebagai obat. Tetapi masih

banyak tumbuhan yang belum tereksplorasi salah satunya yaitu tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri* L.) merupakan salah satu tumbuhan yang banyak ditemukan di Indonesia, ia memiliki potensi sebagai antibakteri karena banyak mengandung komponen bioaktif seperti terpenoid, steroid, alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin. Namun, senyawa aktif yang berperan sebagai antibiofilm belum diketahui. Hal ini didukung penelitian dari Rahman 2012 yang menyimpulkan bahwa adanya pengaruh meniran terhadap pertumbuhan bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus*^[8]. Senyawa terpenoid memiliki beragam efek biologis, termasuk sebagai antimikroba (antijamur, antibakteri, dan antiparasit). Telah dilakukan studi bahwa senyawa terpenoid mampu menghambat pertumbuhan bakteri terhadap spektrum luas bakteri Gram-positif^[9].

Terpenoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder, Sebagian adalah komponen penyusunan minyak atsiri, resin, dan mempunyai aktivitas biologi. Roumondang (2013) melaporkan terpenoid juga mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, penghambat sel kanker, antiinflamasi, gangguan menstruasi, gangguan kulit, dan malaria. Dalam hal ini peneliti menggunakan larutan fraksi n-Heksana untuk menarik senyawa terpenoid dalam meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Senyawa terpenoid merupakan senyawa non-polar sehingga dapat larut dalam n-heksana^[10].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dalam menghambat dan menghancurkan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.

METODE PENELITIAN

Desain, tempat, dan waktu penelitian

Penelitian termasuk dalam jenis studi eksperimental laboratorium menggunakan desain penelitian *in vitro* yang dilakukan untuk mengetahui potensi sampel uji terhadap hambatan dan penghancuran biofilm *Staphylococcus aureus*. Pengujian dan analisis data dilakukan di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Universitas Islam Malang. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan September 2024 hingga Oktober 2024.

Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel simplisia meniran (*Phyllanthus niruri* L.) yang didapatkan dari UPT Laboratorium Materia Medica Batu dengan nomor determinasi 000.9.3/1783/102/20/2024 dan bakteri *Staphylococcus aureus* yang berasal dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran (LPRK) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Ekstraksi etanol meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Ekstraksi dengan menggunakan bahan-bahan seperti simplisia daun meniran, aquades, dan etanol. Sebanyak 80 gram simplisia daun meniran dimasukkan kedalam beaker kemudian di rendam dengan etanol 96%. Beaker ditutup menggunakan aluminium foil kemudian didiamkan di *waterbath shaker* selama 24 jam. Setelah didiamkan selama 24 jam, dilakukan penyaringan dengan menggunakan corong buchner sampai mengering. Hasil penyaringan diolah dengan menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak kental ^[11]. Dilakukan remaserasi sebanyak 2 kali dengan cara yang sama.

Fraksinasi ekstrak daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Mekanisme kerja fraksinasi yang dilakukan dengan metode fraksinasi ECC menggunakan pelarut air dan n-heksana. Ekstrak kental disuspensi dalam air hangat dengan perbandingan 1:6, suspensi dimasukkan ke dalam labu pisah dan ditambahkan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:1. Kemudian dikocok secara perlahan selama 15 menit, didiamkan sehingga terjadi pemisahan pelarut yang akan menghasilkan dua lapisan endapan, pisahkan dan simpan fraksi n-heksana yang telah didapatkan. Dilakukan hal yang sama menggunakan larutan etil asetat dengan perbandingan (1:1), sehingga membentuk dua lapisan endapan ^[12]. Masing-masing fraksi yang didapatkan dipisah.

Uji Fitokimia Fraksi Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Uji fitokimia pada tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dilakukan beberapa uji yaitu : (a) Uji flavonoid. Pada uji ini menggunakan fraksi n-Heksana sebanyak 0,5

ml ditambahkan dengan dengan 0,1 gram serbuk Mg dan ditambah dengan 5 tetes HCl pekat, selanjutnya dikocok kuat. Hasil positif apabila menunjukkan perubahan larutan menjadi warna merah, kuning, atau jingga ^[13]. (b) Uji alkaloid menggunakan sebanyak 0,5 fraksi n-Heksana ditambahkan dengan 0,5 HCl ditambahkan larutan dragendorff sebanyak 10 tetes, setelah larut kemudian ditambahkan dengan tetes pereaksi mayer. Reaksi positif apabila terdapat endapan atau larutan berubah menjadi keruh ^[14]. (c) Uji saponin menggunakan fraksi n-Heksana sebanyak 0,5 ml ditambahkan dengan aquades panas sebanyak 0,5 dengan perbandingan (1:1), kemudian dikocok selama 1 menit. Ekstrak menunjukkan hasil positif saponin apabila terdapat busa yang terbentuk dan setelah ditambahkan larutan HCl tetap stabil ± 5 menit ^[15]. (d) Uji tanin dengan menggunakan sebanyak 0,5 fraksi n-Heksana ditambahkan dengan 10 tetes FeCl₃ 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan ^[16]. dan (e) uji terpenoid dengan menggunakan fraksi n-Heksana sebanyak 0,5 ditambahkan dengan asetat glasial pekat sebanyak 3 tetes kemudian ditambahkan dengan 1 ml H₂SO₄ pekat. Hasil positif apabila menunjukkan terbentuknya warna merah atau hijau kebiruan ^[17].

Standarisasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Pada uji biofilm pertama dilakukan standarisasi bakteri dengan standar *McFarland*. Standar *McFarland* digunakan sebagai acuan untuk mengatur kekeruhan suspensi bakteri, memastikan jumlah bakteri berada dalam kisaran tertentu untuk standarisasi uji mikroba. Standar 0,5 *McFarland* dibuat dengan mencampur 0,05 ml barium klorida dihidrat 1% dengan 9,95 ml asam sulfat 1% ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya diaduk hingga memenuhi standar kekeruhan pada tingkat 0,5 *McFarland* Standard ^[18]. Standarisasi bakteri dilakukan dengan mencampurkan bakteri ke dalam 10 ml *normal saline* menggunakan ose. Kemudian kekeruhan suspensi tersebut disesuaikan dengan standar 0,5 *McFarland*.

Uji Aktivitas Antibiofilm *Staphylococcus aureus* pada *Microtiter Plate Assay 96 Well plate*

Uji yang dilakukan yaitu uji penghambatan dan penghancuran terhadap biofilm bakteri

Staphylococcus aureus. Uji aktivitas penghambatan biofilm dilakukan menggunakan *Microtitter plate assay*. Uji hambatan biofilm dilakukan sebelum biofilm terbentuk sempurna pada media, untuk melihat efektivitas sampel terhadap biofilm. Sedangkan uji aktivitas penghancuran biofilm bakteri *staphylococcus aureus* dilakukan setelah jam ke 48.

BHIB + sukrosa dimasukkan ke dalam *well plate* menggunakan *multichannel pipette* sebanyak 200 µL. Bakteri yang telah disuspensi dimasukkan kedalam masing-masing *well* sebanyak 20ml. Sampel fraksi untuk perlakuan hambatan ditambahkan sesuai peta pada baris 1 dan dilakukan pengenceran bertingkat pada baris 1-5. Ditambahkan DMSO 3% ditambahkan kedalam baris kontrol bias hambatan. *96 well plate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, sampel pada masing-masing *well* dibuang menggunakan pipet. Kemudian, dilakukan pencucian dengan penambahan larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sebanyak 200 µL pada *well* dan langsung dibuang. Selanjutnya ditambahkan sampel fraksi untuk uji penghancuran sesuai peta pada kolom 6-10 sebanyak 120 ul dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian, sampel dibuang menggunakan pipet dan dilakukan pencucian kembali dengan menggunakan larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sebanyak 200 ul dan langsung dibuang. Fiksasi dilakukan dengan menambahkan methanol 96% sebanyak 120 µL dan didiamkan selama 10 menit setelah itu dibuang. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan pewarna *crystal violet* 0,1% yang ditambahkan pada tiap *well* sebanyak 120 ul dan didiamkan selama 3 menit. Setelah dilakukan pewarnaan, kemudian dicuci menggunakan larutan PBS sebanyak 200 µL dan dilakukan pencucian sebanyak 2 kali. Asam asetat 33%

kemudian ditambahkan sebanyak 200 ul untuk melarutkan *crystal violet* agar absorbansi dapat diukur.

Penghitungan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 585 nm untuk mendapatkan nilai OD. Pembacaan spektrofotometer akan menghasilkan nilai sisa dari pembentukan biofilm sehingga dapat dilakukan penghitungan presentase sisa biofilm.

$$\% \text{ hambatan \& penghancuran biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{kp}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan:

OD_{kn} = *Optical Density* kontrol negatif (media yang diberi BHIB + sukrosa 5%)

OD_{kp} = *Optical Density* uji (media yang telah diberikan sampel uji/kelompok perlakuan)

Setelah dilakukan penghitungan dengan menggunakan spektrofotometer nilai yang didapatkan dikonversi ke nilai BBU. Nilai BBU diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$BBU = \frac{Abs}{0.1}$$

Keterangan:

BBU : Biofilm Biomass Unit

Abs : Absorbansi Crystal Violet

HASIL DAN ANALISA DATA

Hasil Uji Fitokimia Fraksi n-Heksana Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Hasil uji fitokimia fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) yang dilakukan secara kualitatif dengan mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam meniran berdasarkan perubahan bentuk dan warna. Adapun hasil uji fitokimia dapat dilihat pada **tabel 1**.

Tabel 1 Hasil Uji Fitokimia

Jenis pengujian	Hasil	Keterangan
Flavonoid	+	Terjadi perubahan larutan menjadi warna merah, kuning, atau jingga.
Alkaloid	-	Tidak terdapat endapan atau perubahan larutan menjadi keruh
Saponin	-	Tidak terdapat busa yang terbentuk dan setelah ditambahkan larutan HCl tetap stabil ± 5 menit

Jenis pengujian	Hasil	Keterangan
Tanin	+	Terjadi perubahan warna menjadi biru tua atau hitam kehijauan
Terpenoid	+	Terjadi perubahan warna menjadi merah atau hijau kebiruan

Keterangan: Tabel 1 menjelaskan mengenai ada atau tidaknya kandungan senyawa yang diujikan, berdasarkan hasil pengujian fitokimia fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) didapatkan hasil bahwa adanya kandungan flavonoid, tanin, dan terpenoid.

Pada pengujian biofilm dengan fraksi n-Heksana menggunakan senyawa terpenoid, dikarenakan pada senyawa terpenoid memiliki sifat non-polar. Senyawa terpenoid memiliki beragam efek biologis, termasuk sebagai antimikroba (antijamur, antibakteri, dan antiparasit). Telah dilakukan studi bahwa senyawa terpenoid mampu menghambat pertumbuhan bakteri terhadap spektrum luas

bakteri Gram-positif dan pada tumbuhan meniran memiliki senyawa tersebut [9].

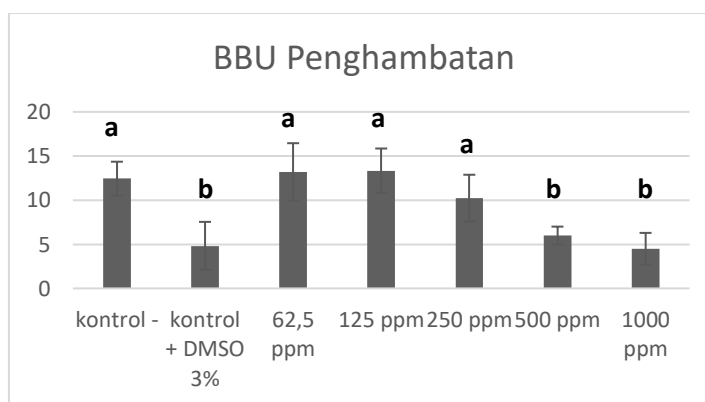
Hasil Uji Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil pengujian hambatan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada **Tabel 2**, pengujian hambatan dengan perhitungan BBU dapat dilihat pada **Gambar 1** dan perhitungan % hambatan pada **Gambar 2**.

Tabel 2 Hasil Uji Penghambatan Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

N	DOSIS	$\bar{X} \pm SD$
5	Kontrol -	12.45 $\pm$ 1.80 ^a
5	Kontrol + DMSO 3%	4.82 $\pm$ 1.02 ^b
5	62,5 ppm	13.19 $\pm$ 2.63 ^a
5	125 ppm	13.34 $\pm$ 2.51 ^a
5	250 ppm	10.24 $\pm$ 3.26 ^a
5	500 ppm	5.98 $\pm$ 2.72 ^b
5	1000 ppm	4.49 $\pm$ 1.90 ^b

Keterangan: Pengujian hambatan biofilm fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan perbedaan dosis 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm berdasarkan dari *uji oneway ANOVA* didapatkan hasil yang signifikan dan memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai sig 0.00 atau kurang dari 0.05. Hasil dikatakan signifikan apabila memiliki nilai sig ($p < 0.05$) atau kurang dari 0.05.

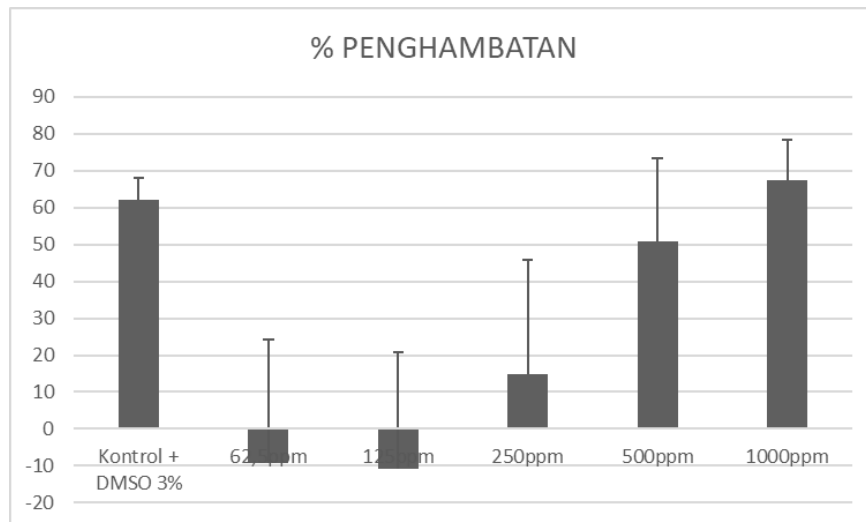


Gambar 1 Histogram Perhitungan BBU Hambatan Biofilm Dengan Perbedaan Dosis Pengujian

Keterangan: Berdasarkan histogram parameter BBU diatas menunjukkan pada dosis 1000 ppm dan 500 ppm memiliki nilai yang rendah dibandingkan dengan dosis pengujian yang lainnya.

Penghitungan biofilm menggunakan parameter BBU (Biomassa Biofilm Unit). BBU merupakan parameter yang digunakan untuk mengukur kapasitas biofilm pada suatu media. Biomassa yang memiliki nilai rendah atau

sedikit menunjukkan jumlah mikroorganisme dalam biofilm berkurang dan sebaliknya jika biomassa memiliki nilai yang tinggi atau besar maka jumlah mikroorganisme dalam biofilm meningkat atau masih banyak ^[19].



Gambar 2 Histogram Perhitungan % Hambatan Biofilm Dengan Perbedaan Dosis Pengujian

Keterangan: Hasil histogram diatas menunjukkan perbedaan persentase efek uji penghambatan biofilm pada berbagai dosis. Nilai presentase tertinggi pada dosis 500 ppm sebesar 50% dan pada dosis 1000 ppm sebesar 67%. Semakin tinggi persentase penghambatan biofilm, maka semakin efektif agen dalam menghambat pembentukan biofilm.

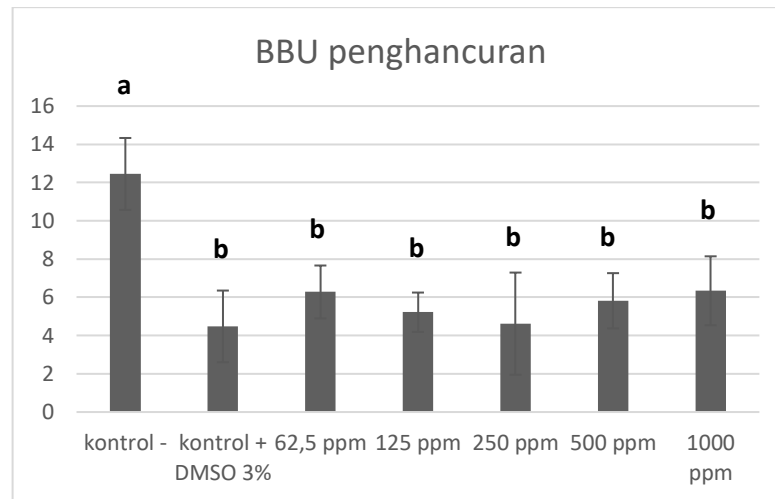
Hasil pengujian penghancuran biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada **Tabel 3**, pengujian hambatan dengan

perhitungan BBU dapat dilihat pada **Gambar 3** dan perhitungan % hambatan pada **Gambar 4**.

Tabel 3 Hasil Uji Penghancuran Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

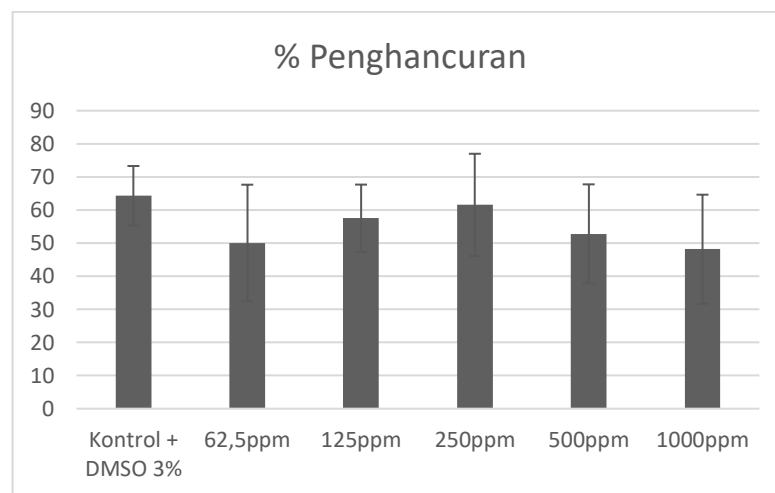
N	DOSIS	$\bar{X} \pm SD$
5	Kontrol -	12.45±1.80 ^a
5	Kontrol + DMSO 3%	4.48±1.44 ^b
5	62,5 ppm	6.28±2.67 ^b
5	125 ppm	5.22±1.02 ^b
5	250 ppm	4.62±1.38 ^b
5	500 ppm	5.82±1.87 ^b
5	1000 ppm	6.34±1.88 ^b

Keterangan: Pada pengujian penghancuran fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan dosis 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm berdasarkan dari uji kruskal wallis memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai 0.003. Sampel dengan perbedaan yang bermakna memiliki nilai sig ($p < 0.05$) atau kurang dari 0.05.



Gambar 3 Histogram Perhitungan Hasil Penghancuran Biofilm Dengan Perbedaan Dosis Pengujian

Keterangan: Berdasarkan histogram parameter BBU diatas menunjukkan pada dosis 250 ppm dan 125 ppm memiliki nilai yang rendah dibandingkan dengan dosis pengujian yang lainnya. Tetapi pada kontrol + (DMSO 3%) menunjukkan nilai yang rendah dibanding sampel yang digunakan, sehingga pada pengujian penghancuran biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat kemungkinan yang memiliki efektivitas sebagai penghancur biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* adalah kontrol + (DMSO 3%).



Gambar 4 Histogram Perhitungan % Penghancuran Biofilm Dengan Perbedaan Dosis Pengujian

Keterangan: Hasil histogram diatas menunjukkan perbedaan persentase efek uji penghancuran biofilm pada berbagai dosis. Nilai presentase tertinggi pada dosis 250 ppm sebesar 61% dan pada dosis 125 ppm sebesar 57%. Semakin tinggi persentase penghancuran biofilm, maka semakin efektif agen dalam menghancurkan biofilm yang telah terbentuk. Tetapi pada kontrol + (DMSO 3%) menunjukkan nilai yang tinggi sebesar 64% dibanding sampel lain, sehingga pada pengujian penghancuran biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat kemungkinan yang memiliki efektivitas sebagai penghancur biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* adalah kontrol + (DMSO 3%).

PEMBAHASAN

Phyllanthus niruri L. merupakan tumbuhan herba kecil yang tumbuh tegak dengan ketinggian 30-60 cm. Batang tumbuhan ini berwarna hijau muda atau hijau tua. Setiap cabang atau rantingnya terdiri dari 8-25 helai daun. Daun-daunnya tersusun berhadapan, kecil dan berbentuk lonjong. Daun berwarna hijau, memiliki ukuran 0,5-2 x 0,25-0,5 cm. Bunga

tumbuhan meniran ini berbentuk kecil, berwarna putih atau kehijauan, terletak di sepanjang cabangnya. Buah pada tumbuhan ini berbentuk kapsul yang mengandung biji kecil [20].

Tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L.) memiliki kandungan senyawa aktif seperti steroid, alkaloid, tannin, dan flavonoid yang menunjukkan aktivitas antibakteri yang efektif terhadap berbagai patogen, termasuk

Staphylococcus aureus. Senyawa-senyawa ini memiliki peran dalam merusak dinding sel bakteri atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen melalui mekanisme kimia alami [21]. Tanaman meniran diketahui memiliki banyak khasiat untuk kesehatan sehingga dapat dijadikan sebagai Solusi alternatif untuk pengobatan suatu penyakit.

Senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, dan terpenoid yang terkandung dalam meniran (*Phyllanthus niruri* L.) diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini dibuktikan oleh penelitian terdahulu bahwa pada meniran (*Phyllanthus niruri* L.) efektif mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan rerata diameter zona hambat sebesar 6,05 cm [22].

Kandungan terpenoid pada tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L.) merupakan komponen yang berpotensi sebagai antibakteri, sehingga akan dihasilkan agen antibakteri yang juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme kerja senyawa terpenoid sebagai zat antibakteri dengan melibatkan kerusakan membran oleh senyawa lipofilik. Terpenoid dapat bereaksi dengan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi, pertumbuhan bakteri terhambat atau mati [23].

Uji Fitokimia

Pada penelitian ini, fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) mengandung senyawa flavonoid yang ditunjukkan oleh perubahan larutan menjadi warna merah, kuning, atau jingga, senyawa tanin yang ditunjukkan adanya perubahan menjadi warna biru tua atau hitam kehijauan, dan senyawa terpenoid yang ditunjukkan perubahan warna menjadi merah atau hijau kebiruan yang ditunjukkan pada **Tabel 1**. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) [24].

Ekstrak meniran memiliki berbagai kandungan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar, semi polar, dan senyawa nonpolar, sehingga perlu dilakukan proses fraksinasi untuk memisahkan beberapa senyawa tersebut berdasarkan kepolarannya. Pelarut yang digunakan pada saat fraksinasi

adalah n-Heksana. Senyawa nonpolar seperti terpenoid yang ada pada ekstrak etanol akan terdistribusi kedalam pelarut n-Heksana [25].

Berdasarkan hasil uji fitokimia penelitian terdahulu, tumbuhan meniran memiliki kandungan senyawa tanin, flavonoid, terpenoid, kumarin, dan polifenol. Pada uji fitokimia mendapatkan hasil bahwa fraksi n-Heksana daun meniran positif mengandung senyawa flavonoid yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi jingga, senyawa tanin yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi hitam kehijauan, serta positif senyawa terpenoid didapatkan perubahan menjadi warna hijau kebiruan [26]. Penelitian lain yang melakukan uji skrining fitokimia pada tumbuhan meniran (*Phyllanthus niruri* L.) juga didapatkan hasil yaitu ekstrak herba meniran mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, dan tanin [27].

Uji Biofilm pada *Microtiter Plate Assay 96 Well plate*

Pembentukan dan evaluasi penghambatan biofilm dilakukan dengan metode *microtiter plate* dengan menggunakan *Crystal violet*. Untuk mengevaluasi biofilm yang dibentuk oleh bakteri *Staphylococcus aureus*, suspensi bakteri setara dengan standar 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) dimasukkan kedalam masing-masing *well*, diinkubasi selama 24 jam. Setelah masa inkubasi 24 jam, sumuran dilakukan penambahan ekstrak sampai dengan penambahan pewarnaan menggunakan kristal violet 0.1% [28].

Terbentuk dan stabilnya zat warna *Crystal violet* pada biofilm yang menempel pada sumuran, pada dasarnya mengikuti mekanisme pengecatan gram pada umumnya. Sebagai bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* memiliki susunan dinding sel yang kompak dengan lapisan peptidoglikan (murein) dan *teichoic acid* mampu mencegah sel protoplasnya mengalami lisis osmotik sekaligus menahan keluarnya zat warna kristal violet saat dibilas [29].

Uji Hambatan Terhadap Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil yang didapatkan pada perhitungan mikrokoloni bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai sig. 0.000 atau kurang

dari 0.005 atau sig ($p < 0.05$) antar dosis pengujian ditunjukkan pada **Tabel 2**. Pada penelitian ini yaitu fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) memiliki efektivitas untuk menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* pada dosis 500 ppm dengan prosentase penghambatan 50% dan 1000 ppm 67% yang ditunjukkan pada **Gambar 2**. Uji penghambatan biofilm bertujuan untuk mendapatkan aktivitas dari meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Pembentukan biofilm pada penelitian ini diukur secara kuantitatif dengan metode *Crystal violet assay*.

Proses pembentukan biofilm pada permukaan padat terjadi dengan dua tahapan. Tahap pertama yaitu pertumbuhan sel dan pembentukan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS), sehingga sel biofilm terakumulasi. Tahap kedua adalah pelepasan dan penempelan kembali. Pencegahan pertumbuhan biofilm dapat dilakukan dengan menghambat atau bahkan mematikan sel agar tidak bertambah, dan mencegah pembentukan EPS, ketika tahap perkembangan biofilm tidak dihambat, maka biofilm yang akan terbentuk semakin banyak dan membentuk struktur tiga dimensi yang mengandung sel-sel terselubung dalam beberapa kelompok yang saling terhubung satu sama lainnya [30]. Media pertumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media BHIB ditambahkan dengan sukrosa 5% yang digunakan untuk media kultur pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Penghancuran Biofilm

Hasil yang didapatkan pada perhitungan mikrokoloni bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai sig. 0.003 atau kurang dari 0.05 atau sig ($p < 0.05$) antar dosis pengujian yang ditunjukkan pada **Tabel 3**. Pada penghitungan persentase penghancuran fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) nilai presentase tertinggi pada dosis 250 ppm sebesar 61% dan pada dosis 125 ppm sebesar 57%. Semakin tinggi persentase penghancuran biofilm, maka semakin efektif agen dalam menghancurkan biofilm yang telah terbentuk. Tetapi pada kontrol + (DMSO 3%) menunjukkan nilai yang tinggi sebesar 64%

dibanding sampel lain, sehingga pada pengujian penghancuran biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat kemungkinan yang memiliki efektivitas sebagai penghancur biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* adalah kontrol + (DMSO 3%) seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 4**. DMSO atau *dimethyl sulfoxide* pada sebuah penelitian yang dipublikasikan di *Folia Microbiologica* meneliti aktivitas antibiofilm DMSO terhadap patogen Gram negatif dan positif. Hasilnya menunjukkan bahwa DMSO dengan konsentrasi yang tinggi memiliki keefektifan dalam membunuh sel biofilm dan mengurangi biomassa biofilm [31].

Biofilm ini resisten terhadap antimikroba dan sistem pertahanan imun tubuh sehingga sulit untuk dihancurkan. Ketidakberhasilan terapi pada biofilm dikarenakan adanya struktur biofilm yang tersusun dari matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang sulit ditembus [32]. Komponen utama penyusun biofilm berupa sel bakteri dan matriks ekstraseluler. Komponen penyusun matriks ekstraseluler ini bervariasi sesuai dengan jenis mikroorganisme pembentuknya serta faktor lingkungan. Beberapa penelitian sebelumnya membuktikan bahwa matriks ekstraseluler ini sebanyak 65% tersusun atas polisakarida. Selain itu beberapa matriks ini tersusun atas glukosida atau *glucophosphates* [33]. Hal ini membuat biofilm sulit untuk dihancurkan.

Peningkatan massa biofilm dikaitkan dengan peningkatan komponen biofilm yang kaya akan *N-Acetyl glucosamine*, atau dikenal sebagai *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA). PIA adalah *poli β (1-6)-N-acetylglucosamine* (PNAG) bermuatan positif dan merupakan komponen eksopolisakarida yang dominan dari matriks polimer ekstraseluler biofilm. Selain itu, PIA secara mekanis dan kimiawi melawan respon imun terhadap *Staphylococcus aureus* termasuk menghambat fagositosis oleh leukosit maupun penghancuran bakteri oleh peptida antimikroba alami inang. Selain itu PIA juga mengurangi penetrasi antimikroba sebagai akibat efek kationik dari polimer PIA yang melapisi biofilm [34].

KESIMPULAN

- a. Fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) melalui uji fitokimia memiliki kandungan senyawa flavonoid, tanin, dan terpenoid.

- b. Fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan dosis 500 ppm dan 1000 ppm memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan biofilm *Staphylococcus aureus*
- c. Uji penghancuran dengan fraksi n-Heksana daun meniran (*Phyllanthus niruri* L.) tiap dosis menunjukkan kemampuan tetapi tidak sebesar DMSO 3%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya ucapkan kepada pihak yang terlibat dari Universitas Islam Malang, Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Universitas Islam Malang yaitu Ibu Arni, Ibu Nofie, Ibu Erlin, dan Ikatan Orangtua Mahasiswa FK UNISMA yang telah memberikan saya kesempatan untuk melakukan penelitian serta penyusunan jurnal penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badaring DR, Sari SPM, Nurhabiba S, Wulan W, Lembang SAR. Uji Ekstrak Daun Maja (*Aegle marmelos* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Indonesian Journal of Fundamental Sciences* 2020;6(1).
2. Kart D, Kustimur AS, Sağiroğlu M, Kalkancı A. Evaluation of antimicrobial durability and anti-biofilm effects in urinary catheters against *Enterococcus faecalis* clinical isolates and reference strains. *Balkan Med J* 2017;34(6):546–52.
3. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5.
4. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics* 2023;12(1).
5. Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol* 2017;104(3):365–76.
6. Herman-Bausier P, El-Kirat-Chatel S, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrêne YF. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein a mediates cell-cell adhesion through low-affinity homophilic bonds. *mBio* 2015;6(3):1–10.
7. Liu H, Shukla S, Vera-González N, Tharmalingam N, Mylonakis E, Fuchs BB, et al. Auranofin Releasing Antibacterial and Antibiofilm Polyurethane Intravascular Catheter Coatings. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9.
8. Rahman DT, Sutrisna EM, Candrasari A. Uji Efek Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Dan Kloroform Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 11229 Secara in vitro. 2012.
9. Gallegos-Flores PI, Bañuelos-Valenzuela R, Delgadillo-Ruiz L, Meza-López C, Echavarría-Cháirez F. Actividad Antibacteriana De Cinco Compuestos Terpenoides: Carvacrol, Limoneno, Linalool, α -Terpineno Y Timol † [Antibacterial Activity of Five Terpenoid Compounds: Carvacrol, Limonene, Linalool, α -Terpinene and Thymol]. 2019.
10. Sains JK, Aplikasi D, Laksono FB, Fachriyah E, Kusri D. Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi 17 (2) (2014): 37-42 Isolasi dan Uji Antibakteri Senyawa Terpenoid Ekstrak N-Heksana Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* 2014;17(2):37–42.
11. Widiyawati D, Biologi J, Sains F, Analis Kesehatan J, Ilmu Kesehatan Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri F. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella* sp. dan *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Sains dan Teknologi* | 2017;6(2).
12. Anggraini SW. Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat dan N-Heksan dari Ekstrak metanol Kulit Batang Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Terhadap Bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311. 2021;
13. Paputungan Z, Wonggo D, Kaseger BE. Uji Fitokimia Dan Aktivitas

- Antioksidan Buah Mangrove *Sonneratia alba* Di Desa Nunuk Kecamatan Pinolosian Kabupaten Bolaang Mongondow Selatan. 2017.
14. Harborne JB. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. THIRD EDITION. Boundary Row, London: 1998.
 15. Lina M, Kumalasari F, Andiarna F. Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.). *Indonesian Journal for Health Sciences* 2020;4(1):39–44.
 16. Purba A, Program A, Kimia S, Sains F, Teknologi D, Islam U, et al. Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Dalam Ekstrak Metanol Bunga Turi Merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers). 2017.
 17. Juliana Najoo J, John Runtuwene MR, Wewengkang DS. Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun tiga (*Allophylus cobbe* L.). 2016.
 18. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol [Internet]. 2016. Available from: www.atcc.org
 19. De la Cruz-Claire ML, Céspedes-Llave AA, Ulloa MT, Benito-Lama M, Domínguez-álvarez E, Bastida A. Inhibition–disruption of *Candida glabrata* biofilms: Symmetrical selenoesters as potential anti-biofilm agents. *Microorganisms* 2019;7(12).
 20. Ervina N, Mulyono Y. Etnobotani Meniran Hijau (*Phyllanthus Niruri* L) Sebagai Potensi Obat Kayap Ular (Herpes Zoster) dalam Tradisi Suku Dayak Ngaju [Internet]. 2019. Available from: <http://ejournal.upr.ac.id/index.php/JMS>
 21. Tiwana G, Cock IE, Cheesman MJ. *Phyllanthus niruri* Linn.: Antibacterial Activity, Phytochemistry, and Enhanced Antibiotic Combinatorial Strategies. *Antibiotics* 2024;13(7):654.
 22. Munfaati PN, Ratnasari E, Trimulyono G. Aktivitas Senyawa Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* Secara in Vitro [Internet]. 2015. Available from: <http://ejournal.unesa.ac.id/index.php/leinterabio>
 23. Wulansari ED, Lestari D, Khoirunissa MA. Kandungan Terpenoid Dalam Daun Ara (*Ficus carica* L.) Sebagai Agen Antibakteri Terhadap Bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon* 2020;1–7.
 24. Kiyato P, Kamu VS, Runtuwene MRJ. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Pelarut dari Ekstrak Metanol Batang Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb). *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi* 2022;7(2):1–7.
 25. Harborne JB,. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Second edition. 1987.
 26. Vifta RL, Advistasari YD. Skrining Fitokimia, Karakterisasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.) *Pytochemical Screening, Characterization, and Determination of Total Flavonoids Extracts and Fractions of Parijoto Fruit (Medinilla speciosa B.)*. Prosiding Seminar Nasional Unimus 2018;1.
 27. Rivai H, Septika R, Boestari A. Karakterisasi Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L) Dengan Analisa Fluoresensi. 2013.
 28. Kawarai T, Narisawa N, Yoneda S, Tsutsumi Y, Ishikawa J, Hoshino Y, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation using extracts from Assam tea compared to green tea. *Arch Oral Biol* 2016;68:73–82.
 29. Arjuna A, Setya Pratama W, Arjuna Fakultas Farmasi A. Uji Pendahuluan Anti-biofilm Ekstrak Teh Hijau dan Teh Hitam Pada *Streptococcus mutans* melalui Metode Microtiter Plate (An initial study on anti-biofilm activity of green tea dan black tea extracts on *Streptococcus mutans* via mictotiter plate assay). *Galenika Journal of Pharmacy* [Internet] 2018;4(1):2442–8744. Available from: <http://jurnal.untad.ac.id/jurnal/index.php/Galenika/index>

30. Besan EJ, Rahmawati I, Saptarini O. PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia) Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* Antibiofilm Activity of Butterfly Pea Flower (*Clitoria ternatea* L.) Extract and Fractions against *Staphylococcus aureus*. 2023.
31. Yahya MFZR, Alias Z, Karsani SA. Antibiofilm activity and mode of action of DMSO alone and its combination with afatinib against Gram-negative pathogens. 2017;
32. Devita Gunardi W. Tinjauan Pustaka Mekanisme Biomolekuler *Pseudomonas aeruginosa* dalam Pembentukan Biofilm dan Sifat Resistensi terhadap Antibiotika. 2016.
33. Hamidah Ln. Teknik Analisa Struktur Dan Komponen Biofilm Pada Pengolahan Air Dan Air Limbah. Journal Of Research And Technology 2015;1(1).
34. Rofian Sultan A. Uji Daya Hambat Neobavaisoflavone Terhadap Pembentukan Biofilm *Staphylococcus Aureus* Secara In Vitro. 2022