

## Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Claudius Hendraman B. Tobi, Opstaria Saptarini dan Ismi Rahmawati\*

Program Studi S2 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Jebres, Surakarta-57127.

\*email korespondensi: [ismirahmawati@setiabudi.ac.id](mailto:ismirahmawati@setiabudi.ac.id)

Received 12 August 2020, Accepted 18 January 2022, Published 15 March 2022

**Abstrak:** Biofilm merupakan kumpulan dari sel-sel mikrobial yang melekat secara ireversibel pada suatu permukaan dan terbungkus dalam matriks EPS (*Extracellular Polymeric Substances*). Salah satu bakteri infeksius yang memproduksi biofilm adalah *S. aureus*. Biji pinang diketahui mengandung flavonoid, alkaloid dan tanin yang memiliki mekanisme antibiofilm dan antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak dan fraksi biji pinang terhadap bakteri *S. aureus*. Ekstraksi biji pinang dilakukan dengan metode maserasi, fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut air, etil asetat dan n-heksan. Aktivitas penghambatan dan degradasi biofilm dilakukan dengan metode pewarnaan kristal violet yang dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Persen penghambatan dan degradasi yang diperoleh dianalisis menggunakan uji statistik ANAVA dua arah. Persen penghambatan dan degradasi tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak etanol yaitu secara berturut-turut 70,17% dan 54% dengan nilai  $IC_{50}$  secara berturut-turut yaitu -0,4 mg/ml dan 5,9 mg/ml. Hasil uji statistik menunjukkan setiap kelompok sampel dan konsentrasi memberikan pengaruh yang signifikan pada persen penghambatan dan degradasi biofilm.

**Kata kunci:** antibiofilm; ekstrak; fraksi; biji pinang; *S. aureus*

**Abstract.** **Antibiofilm Activity of Areca Nut (*Areca catechu* L.) Extract and Fractions Against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.** Biofilm is an association of microbial cells that are irreversibly attached to a surface and encased in an EPS matrix (Extracellular Polymeric Substances). One of infectious bacteria that produce biofilms is *S. aureus*. Areca nut seed is known containing flavonoid, alkaloid and tannin that have antibiofilm and antibacterial mechanism. This study aimed to determine the antibiofilm and antibacterial activity of areca nut extracts and fractions against *S. aureus* bacteria. Areca nut extraction was done by maceration method, fractionation was carried out by liquid-liquid extraction method using water, ethyl acetate and n-hexane as solvent. Biofilm inhibition and degradation activities were carried out by violet crystal staining method which was read at a wavelength of 595 nm. Percent of inhibition and degradation obtained were analyzed using a two-way ANOVA statistical test. The highest percentage of inhibition and degradation was shown by ethanol extract were 70,17% and 54% against *S. aureus* with  $IC_{50}$  were -0,4 mg/ml and 5,9 mg/ml against *S. aureus*. Statistical test results showed that each sample and concentration groups had a significant effect on the percent inhibition and degradation of biofilms.

**Keywords:** antibiofilm; extract; fractions; areca nut seed; *S. aureus*

### 1. Pendahuluan

Biji pinang memiliki berbagai aktivitas antara lain ekstrak metanol terbukti memiliki aktivitas anti bakteri (Faden, 2018), beraktivitas antioksidan dan antibakteri (Shen *et al.*, 2017).

Shamim & Maryam (2017) dalam penelitiannya menggunakan ekstrak air, metanol dan etanol biji pinang sebagai antibiofilm terhadap *B. subtilis*. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 100% masing-masing ekstrak biji pinang (ethanol, metanol dan air) memiliki aktifitas antibiofilm terhadap bakteri *B. subtilis* secara berturut-turut sebesar 40%, 30%, dan 60%. Konsentrasi ekstrak yang sama juga masing-masing memiliki aktivitas degradasi biofilm sebesar 40%. Aktivitas ini sangat dipengaruhi oleh kandungan fitokimia dalam biji pinang.

Senyawa catechin dan quercetin dilaporkan sebagai antibiofilm bakteri (Asahi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2013). Mekanisme utama antibiofilm quercetin mencegah terjadinya adhesi bakteri, mempengaruhi jalur quorum-sensing, perubahan membran plasma bakteri, penghambatan efflux pumps, dan memblokir sintesis asam nukleat (Memariani *et al.*, 2019). Catechin pada daun teh memiliki mekanisme mengganggu biofilm yang sudah terbentuk dan menghambat pembentukannya (Asahi *et al.*, 2014). Hasil skrining fitokimia biji pinang menunjukkan beberapa kandungan senyawa antara lain alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid, steroid, asam lemak, antrakuinon, glikosida jantung, fenol, asam amino, saponin (Peng *et al.*, 2015; Vinay & Chandrasekhar, 2019; Vastrad *et al.*, 2021). Hasil analisis LC-MS dari senyawa flavonoid antara lain rutin, myricetin, catechin, naringenin, quercetin, hesperetin, apigenin, luteolin (Vastrad *et al.*, 2021). Berdasarkan kandungan senyawa tersebut, terlihat bahwa senyawa catechin dan quercetin yang memiliki aktivitas antibiofilm berada dalam ekstrak biji pinang dengan pelarut yang lebih polar etanol dan metanol (Wang *et al.*, 2021). Penelitian terhadap aktivitas antibiofilm ekstrak etanol yang dilanjutkan dengan fraksinasi dengan pelarut air, etil asetat dan n-heksan biji pinang belum dilaporkan. Sehingga penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak dan fraksi biji pinang terhadap bakteri *S. aureus*. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat akan berdampak terhadap terjadinya resistansi. Bakteri *Streptococcus sp* dan *S. aureus* merupakan bakteri yang memiliki resistensi yang terbanyak di RSUD Bangil Kabupaten Pasuruan (Rachmawati *et al.*, 2020). Bakteri *S. aureus* menghasilkan biofilm yang menyebabkan sifat resisten pada bakteri tersebut. Pembentukan biofilm *S. aureus* melalui regulasi gen *agr*, *sarA* dan *sigB* (Archer *et al.*, 2011). Peneliti menggunakan ekstrak dan ketiga fraksi tersebut untuk melihat sampel mana yang memiliki aktivitas antibiofilm teraktif, dimana ketiga fraksi tersebut berada pada tingkat kepolaran yang berbeda.

## 2. Bahan dan Metode

### 2. 1. Bahan

Biji pinang (*Areca catechu*), etanol teknis 96% (Brataco; Tangerang, Indonesia), aquades (Smart-Lab; Tangerang, Indonesia), etil asetat >99,8% (Merck; Darmstadt, Jerman), n-heksan (Merck; Darmstadt, Jerman), pereaksi Dragendrof, pereaksi Liebermann Burchard, HCL 37%

(Merck; Darmstadt, Jerman), serbuk magnesium (Reidel de haen; Seelze, Jerman), FeCl<sub>3</sub> 99% (Merck; Darmstadt, Jerman), NaOH 0,25 N (Merck; Darmstadt, Jerman), dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N (Merck; Darmstadt, Jerman). Bakteri *S. aureus* ATCC 25923, Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Merck; Darmstadt, Jerman), Nutrient Agar (NA) (Merck; Darmstadt, Jerman), Agar Darah (Oxoid; Hampshire, UK), kristal violet 1% (Sigma Aldrich; Singapore), NaCl fisiologis 0,9%, (Merck; Darmstadt, Jerman), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck; Darmstadt, Jerman), Ciprofloxacin 200 mg/100 ml (Hexphram Jaya; Jakarta, Indonesia), DMSO >99,9% (Merck; Darmstadt, Jerman) dan Vogel Jhonson Agar (VJA) (Oxoid; Hampshire, UK), Kalium Telurit 1% (Neogen; Lancashire, UK).

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Ekstraksi

Biji pinang diambil dari Waena, Jayapura, Papua diambil pada pagi hari dalam keadaan segar dan sudah matang, ditunjukkan dengan kulit buah hijau, sedikit kekuningan dengan tekstur daging yang belum mengeras. Biji pinang yang telah diambil dideterminasi di laboratorium B2P2TOOT Tawangmangu. Penyiapan ekstrak dilakukan dengan pembuatan simplisia biji pinang yang dibuat serbuk dengan cara simplisia diblender. Serbuk biji pinang diambil 500 gram dan direndam dengan etanol 96% (1:10) dalam wadah kaca. Maserasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang dengan sesekali dilakukan pengadukan selama 6 jam pertama. Maserat disaring menggunakan kertas Whatman no. 1 kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary* evaporator pada suhu 55°C hingga diperoleh ekstrak kental dan dihitung rendemennya.

### 2.2.2. Standarisasi ekstrak

Penetapan susut pengeringan, penetapan kadar air dan kadar abu dilakukan berdasarkan metode yang terdapat pada Farmakope Herbal Indonesia (Kementrian Kesehatan RI, 2017), pengujian angka lempeng total dilakukan berdasarkan metode Farmakope Indonesia edisi VI (Kementrian Kesehatan RI, 2020).

### 2.2.3. Fraksinasi cair-cair ekstrak

Metode fraksinasi adalah ekstraksi cair-cair terhadap ekstrak etanol biji pinang menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan air. Ekstrak etanol biji pinang sebanyak 20 gram dilarutkan sedikit dengan etanol, kemudian dipartisi dengan air 50 ml dan pelarut n-heksan 50 ml ke dalam corong pisah yang diulang sebanyak 3 kali. Fraksi n-heksan merupakan filtrat yang berada di atas dan fraksi air merupakan filtrat yang berada di bawah. Fraksi n-heksan dipisahkan dari fraksi air dan ditampung kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu penangas 50 °C. Fraksi air sisa dari fraksi n-heksan kemudian dipartisi dengan pelarut etil asetat

50 ml menggunakan corong pisah yang diulang sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang terletak di atas dan fraksi air terletak di bawah. Fraksi etil asetat dipisahkan dari fraksi air kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu penangas 50 °C. Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air yang kemudian dikeringkan pada *water bath*.

#### 2.2.4. Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi

Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi biji pinang dilakukan menggunakan metode yang ada pada buku Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (Endarini, 2016). Identifikasi bakteri meliputi identifikasi koloni, identifikasi biokimia dan pembuatan suspensi bakteri dilakukan menggunakan metode yang digunakan oleh Agustie & Samsumaharto (2013).

#### 2.2.5. Persiapan sampel uji

Kontrol uji yang digunakan berupa ekstrak etanolethanol, fraksi air, etil asetat dan n-heksan biji pinang. Pembuatan larutan uji diawali dengan menimbang tiap-tiap sampel sebanyak 4, 6, 8 dan 10 mg kemudian dilarutkan masing-masing dalam DMSO 10% hingga 10 ml sehingga diperoleh masing-masing konsentrasi sebesar 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 mg/ml Kemudian diambil volume yang dibutuhkan untuk pengujian. Pembuatan larutan kontrol positif dilakukan dengan mengambil sediaan injeksi ciprofloxacin 200 mg/100 ml sebanyak 0,5 ml dan di-addkan dengan aquades steril hingga 10 ml sehingga dihasilkan konsentrasi sebesar 1 mg/ml.

#### 2.2.6. Optimasi waktu pembentukan biofilm

Optimasi waktu pembentukan biofilm dilakukan menggunakan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Suspensi disetarakan dengan Mc Farlan 0,5 diambil sebanyak 200 µL dimasukkan ke tiap well kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C. Waktu inkubasi dilakukan pengamatan pada hari ke 1, 2 dan 3. Setelah masa inkubasi, microplate dicuci menggunakan air steril sebanyak tiga kali kemudian 200 µL larutan kristal violet 1% dimasukkan ke dalam tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Microplate dicuci dengan menggunakan air steril sebanyak tiga kali dan dibiarkan kering pada suhu ruang. Setelah microplate kering, 200 µL etanol etanol96% dimasukkan ke dalam tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pembacaan OD (*Optical Density*) menggunakan alat iMark-Biorad Microplate Reader pada panjang gelombang 490nm, 595nm dan 655nm. Penggunaan ketiga panjang gelombang tersebut bertujuan untuk membandingkan panjang gelombang manakah yang paling optimal dalam membaca pertumbuhan biofilm yang ditunjukkan dengan hasil nilai OD terbesar. Panjang gelombang dan waktu inkubasi yang paling optimal akan digunakan dalam uji aktivitas penghambatan dan degradasi biofilm.

### 2.2.7. Uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm

Uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan memasukkan sebanyak 70  $\mu\text{L}$  medium BHI, 70  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri dan 70  $\mu\text{L}$  larutan uji pada tiap sumuran, kecuali sumuran kontrol negatif kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu inkubasi optimal. Setelah masa inkubasi, microplate dicuci dengan air steril kemudian ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  larutan kristal violet 1% ke dalam tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Microplate dicuci dengan menggunakan air steril sebanyak tiga kali dan dibiarkan kering pada suhu ruang. Setelah microplate kering, 200  $\mu\text{L}$  etanol 96% dimasukkan ke dalam tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pembacaan OD menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 595nm. Masing-masing uji dibuat replikasi 3 kali.

### 2.2.8. Uji aktivitas degradasi pembentukan biofilm

Uji aktivitas degradasi pembentukan biofilm dilakukan dengan menambahkan 70  $\mu\text{L}$  medium BHI + 70  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri yang setara dengan  $1,5 \times 10^6$  CFU/mL ke dalam tiap sumuran kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu inkubasi optimal. Setelah masa inkubasi, isi sumuran dicuci menggunakan air steril kemudian dimasukkan larutan uji sebanyak 70  $\mu\text{L}$  kemudian microplate kembali diinkubasi pada suhu 37 °C selama 90 menit. Selanjutnya dilakukan cara yang sama pada uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm untuk menentukan degradasi biofilm. Persentasi penghambatan dan degradasi biofilm dapat dihitung dengan rumus Persamaan 1.

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

**Persamaan 1.** Persentasi penghambatan dan degradasi biofilm. Keterangan : OD (*Optical Density*).

Penentuan nilai  $\text{IC}_{50}$  dihitung setelah diperoleh rata-rata persen penghambatan dan degradasi pembentukan biofilm dari masing-masing konsentrasi ekstrak dan fraksi-fraksi. Penentuan  $\text{IC}_{50}$  menggunakan persamaan garis regresi linear antara persen penghambatan/degradasi pembentukan biofilm dengan konsentrasi ekstrak dan fraksi-fraksi untuk melihat hubungan antara konsentrasi dengan persen penghambatan/degradasi biofilm dalam menghambat/mendegradasi 50% biofilm.

### 2.2.9. Analisis data

Hasil pembacaan merupakan nilai absorbansi yang menggambarkan kuantitas pembentukan biofilm dan degradasi biofilm. Analisis data menggunakan SPSS statistik dengan nilai signifikan  $p < 0,05$ . Digunakan uji ANAVA dua arah apabila data yang diperoleh

terdistribusi normal dan homogen sedangkan digunakan uji non parametrik apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan tidak homogen.

### 3. Hasil dan Pembahasan

Serbuk kering yang di dapat dari simplisia biji pinang dari 1.000 gram dengan rendemen 50%. Ekstrak kental yang diperoleh dari evaporasi maserat sebesar 144,76 gram dengan rendemen 28,95 %. Penetapan nilai rendemen ekstrak kental biji pinang sudah sesuai dengan Farmakope Herbal Indonesia yaitu tidak kurang 16,50% (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Nilai ini sesuai dengan penetapan rendemen ekstrak kental biji pinang dalam Farmakope Herbal Indonesia yaitu tidak kurang 16,50% (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Persentase perolehan hasil ekstrak untuk mengetahui jumlah simplisia yang dibutuhkan untuk membuat sejumlah ekstrak kental biji pinang. Nilai rendemen yang tinggi menunjukkan banyaknya komponen senyawa bioaktif yang dapat disari dari ekstrak (Nurhayati *et al.*, 2009).

Etanol merupakan suatu cairan mudah menguap yang biasa digunakan sebagai pelarut bagi kebanyakan senyawa organik. Etanol bersifat pelarut universal dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar. Itu sebabnya etanol juga bisa bercampur dengan air. Kepolaran etanol disebabkan adanya gugus –OH yang bersifat polar, sementara gugus etil (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-) merupakan gugus non polar (McMurry, 2012). Etanol 96% dipertimbang sebagai cairan penyari karena lebih efektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dapat bercampur dengan air dalam segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit. Etanol dapat melarutkan alkaloid basah, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakuinon, flavonoid, damar dan klorofil. Lemak, malam tanin dan saponin hanya sedikit larut (Sa'dah & Henny, 2015).

**Tabel 1.** Hasil karakterisasi ekstrak etanol biji pinang dengan parameter susut pengeringan, kadar air, kadar abu, angka lempeng total dengan pengujian direplikasi sebanyak 3 kali.

Sampel	Parameter	Metode	Syarat mutu	Hasil uji	Satuan
Ekstrak etanol biji pinang	Susut pengeringan	Thermogravimetri	-	12,632% ± 0,104	%
	Kadar air	Thermogravimetri	<10%	8,374% ± 0,796	%
	Kadar abu	Gravimetri	<1,4%	0,879% ± 0,027.	%
	Angka lempeng total	<i>Pour plate</i>	≤10 <sup>4</sup> /g	<1 x 10 atau 0	Koloni/g

Hasil karakteristik ekstrak etanol biji pinang dapat dilihat pada Tabel 1. Nilai rata-rata susut pengeringan ekstrak etanol biji pinang yang diperoleh adalah 12,632% ± 0,104. Susut pengeringan menunjukkan besarnya senyawa yang menguap selama proses pengeringan. Senyawa- senyawa yang hilang antara lain: air, minyak atsiri, pelarut (ethanol) dan senyawa

lainnya yang mudah menguap. Nilai susut pengeringan dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah simplisia yang dibutuhkan saat membuat ekstrak.

Nilai rata-rata kadar air ekstrak etanol biji pinang yang diperoleh adalah  $8,374\% \pm 0,796$ . Nilai ini sesuai dengan penetapan kadar air ekstrak biji pinang dalam Farmakope Herbal Indonesia yaitu tidak lebih dari 10% (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Kadar air menentukan kualitas suatu ekstrak. Keberadaan air dalam ekstrak dapat mempengaruhi stabilitas ekstrak karena air merupakan media pertumbuhan mikroorganisme yang dapat merusak ekstrak.

Nilai rata-rata kadar abu ekstrak etanol biji pinang yang diperoleh adalah  $0,879\% \pm 0,027$ . Hasil penetapan kadar abu ekstrak biji pinang sesuai standar kualitas dalam Farmakope Herbal Indonesia tidak lebih dari 1,4% (Kementrian Kesehatan RI, 2017). Nilai ini menunjukkan kandungan mineral dan zat anorganik yang terkandung di dalam ekstrak. Prinsipnya dengan memanaskan ekstrak hingga senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sampai hanya tinggal unsur mineral dan anorganik.

Hasil penetapan ALT ekstrak etanol biji pinang yang diperoleh adalah  $<1 \times 10$  atau 0 koloni/g. Nilai ini menunjukkan jumlah koloni bakteri tiap 1 g ekstrak dikalikan faktor pengenceran, dengan kata lain tidak terdapat koloni pada media. Berdasarkan nilai ALT tersebut, diketahui bahwa ekstrak etanol biji pinang memenuhi persyaratan uji karena menunjukkan jumlah koloni sesuai yang ditetapkan pada syarat mutu yaitu  $\leq 10^5$  koloni/g (BPOM, 2019).

Fraksinasi merupakan metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut atau lebih yang tidak bercampur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik. Hasil fraksinasi dapat dilihat pada Tabel 2. Fraksinasi juga dikatakan sebagai ekstraksi cair cair. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksan, etil asetat dan air dimana ketiga pelarut tersebut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda secara berturut-turut dari nonpolar ke polar. Tujuan dari fraksinasi ini adalah memisahkan komponen-komponen senyawa bioaktif dari ekstrak etanol biji pinang berdasarkan tingkat kepolaran.

**Tabel 2.** Hasil persentase rendemen fraksinasi ekstrak etanol biji pinang dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan air.

Sampel	Pelarut	Hasil (gram)	Rendemen (%)
20 g ekstrak etanol biji pinang	n-Heksan	1,02	5,1
	Etil asetat	4,33	21,65
	Air	11,13	55,65

Kuantitas suatu senyawa bioaktif dalam sebuah fraksi yang dapat mempengaruhi aktivitas fraksi tersebut ditentukan dengan perbedaan jumlah tiap fraksi. Bobot total ketiga fraksi adalah 16,48 g (82,4%) sedangkan bobot yang hilang adalah 3,52 (17,6%). Kehilangan bobot ini terjadi

selama proses fraksinasi dan evaporasi yang disebabkan adanya sisa sampel yang tidak terambil secara baik pada alat fraksinasi dan adanya susut pengeringan pada saat pemanasan pada water bath.

Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak ethanol, fraksi air, etil asetat dan n-heksan biji pinang meliputi uji flavonoid, tanin, alkaloid, kuinon, terpenoid, steroid dan saponin dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil identifikasi pada tabel 3 terlihat bahwa ekstrak ethanol, fraksi air dan fraksi etil asetat biji pinang mengandung senyawa bioaktif yaitu flavonoid, tanin, alkaloid, kuinon, terpenoid dan saponin, sedangkan semua senyawa tersebut tidak teidentifikasi pada fraksi n-heksan. Senyawa-senyawa tersebut dapat ditarik oleh n-heksan tetapi kadarnya sangat sedikit sehingga tidak dapat teridentifikasi menggunakan metode pewarnaan. Senyawa lainnya yang dapat ditarik oleh n-heksan adalah lemak, karotenoid dan resin. Terdapat kelemahan identifikasi warna dibandingkan dengan metode kromatografi dalam hal akurasi sebagai uji pendahuluan. Kelemahan tersebut antara lain kualitas reagen yang buruk dapat mempengaruhi sensitifitasnya, selain itu kondisi dimana kadar senyawa yang sangat sedikit di dalam sampel sehingga tidak cukup kuat dalam bereaksi dengan reagen untuk menunjukkan warna yang sesuai.

**Tabel 3.** Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak ethanol, fraksi air, etil asetat dan n-heksan biji pinang. Keterangan: (+) positif: mengandung senyawa bioaktif; (-) negatif: tidak mengandung senyawa bioaktif.

Senyawa Bioaktif	Pereaksi	Pengamatan	Ekstrak	Fraksi air	Fraksi etil asetat	Fraksi n-heksan
Flavonoid	Mg + HCl pekat	Merah	+	+	+	-
Tanin	Air panas + FeCl	Hijau kehitaman	+	+	+	-
Alkaloid	HCl + Dragendorf	Endapan jingga	+	+	+	-
Kuinon	Air panas + NaOH	Merah	+	+	+	-
Terpenoid	CHCl <sub>3</sub> + Lieberman Burchard	Merah	+	+	+	-
Steroid	CHCl <sub>3</sub> + Lieberman Burchard	Biru	-	-	-	-
Saponin	Air panas + HCl 2N	Busa yang stabil ± 5 menit	+	+	+	-

Kandungan kimia utama dari pinang adalah polifenol, lemak, polisakarida, serat, dan protein. Biji pinang juga mengandung katekin, tanin (15%), gom dan alkaloid (Joshi *et al*, 2012). Peng *et al.*, (2015) juga melaporkan bahwa total kandungan alkaloid pada biji pinang



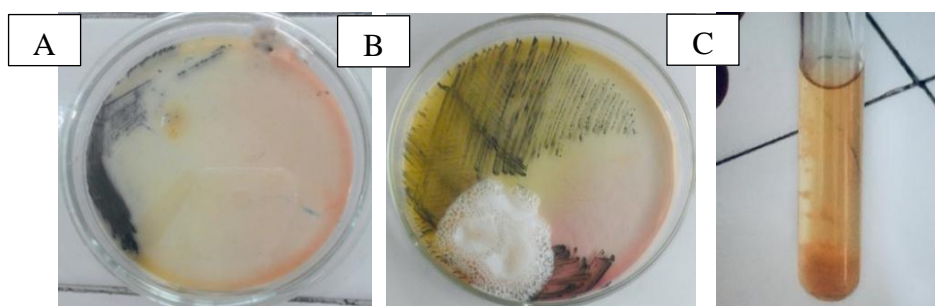
adalah sekitar 0.3-0.7%. Kandungan alkaloid utama dalam pinang yaitu metil nikotinat, etil nikotinat dan nikotin arekolin, arekaidin, guavakolin, guavasin, arekolidin, metil N-metilpiperidin-3-karboksilat, etil N-metilpiperidin-3-karboksilat, isoguvasin, dan homoarekolin. Flavonoid yang diisolasi dari biji pinang yaitu luteolin, isorhamnetin, krisoeriol, kuersetin; 4', 5'-dihidroksi-3', 5', 7-trimetoksiflavonon; 5, 7, 4-trihidroksi-3', 5'- dimetoksi flavanon; likuiritigenin dan jakarubin. Jenis utama senyawa tanin pada tanaman pinang adalah katekin dan epikatekin, diantaranya leukosianidin, prosianidin A1, prosianidin B1, prosianidin B2, arekatanin A1, arekatanin B1, arekatanin C1, arekatanin A2, arekatanin A3 dan arekatanin B2, asam galat. Senyawa triterpenoid yaitu sikloartenol diisolasi dari biji pinang. Lima asam lemak yang telah teridentifikasi pada biji pinang larut dalam etanol yaitu asam laurat, asam miristat, asam palmitat, asam stearat dan asam oleat. Asam p-hidroksibenzoat, epoksikoniiferil alkohol, 4-[3'-(hidroksimetil) oksiran-2'-il] -2,6- dimetoksifenol, asam protokatekat dan asam isovanilat telah diisolasi dari biji pinang pada tahun 2010. Tahun 2012, resveratrol, asam ferulat, asam vanilat dan de-Ometilasi diplodin.

Identifikasi bakteri *S. aureus* ditunjukkan pada Gambar 1. Gambar A pengujian dengan mengkultur *S. aureus* pada media VJA. Hasil positif ditunjukkan oleh koloni yang berwarna hitam dan warna kuning di sekitar koloni pada media VJA. Koloni hitam ini disebabkan karena *S. aureus* mampu mereduksi *potassium tellurite* (yang ditambahkan pada media) menjadi logam tellurium yang mengakibatkan koloni berwarna hitam sedangkan warna kuning di sekitar koloni diakibatkan adanya reaksi fermentasi manitol yang menyebabkan suasana menjadi asam sehingga *phenol red* dalam media berubah menjadi warna kuning (Jawetz *et al*, 2016).

Identifikasi biokimia *S. aureus* terdiri atas uji katalase dan uji koagulase. Tujuan uji katalase pada bakteri berbentuk kokus adalah untuk membedakan antara *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, dimana kelompok *Staphylococcus* bersifat katalase dan koagulase positif. Uji katalase dilakukan dengan penambahan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  bersifat toksik terhadap sel karena bahan ini menginaktifkan enzim dalam sel. Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  yang ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung gas. Hidrogen peroksida juga dapat terbentuk sewaktu metabolisme aerob sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob pasti menguraikan bahan tersebut (Jawetz *et al*, 2016). Hasil uji dapat dilihat pada Gambar 2.

Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim koagulase. Produksi koagulase adalah kriteria yang paling umum digunakan untuk identifikasi *S. aureus*. Reaksi koagulase positif ditunjukkan dengan adanya penjedalan. Koagulase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh *S. aureus* yang dapat menggumpalkan

plasma dengan bantuan faktor yang terdapat dalam serum. Faktor reaksi koagulase serum bereaksi dengan enzim koagulase untuk menghasilkan esterase dan aktivitas pembekuan dengan cara yang sama, yaitu pengaktifan protrombin menjadi trombin. Enzim koagulase bereaksi terhadap bentuk kompleks yang dapat mengkatalis perubahan fibrinogen menjadi bekuan fibrin. Fibrin juga tersimpan pada permukaan *S. aureus* yang mampu melindungi bakteri dari kerusakan sel akibat aksi fagositosis sel (Jawetz *et al*, 2016).



**Gambar 1.** Identifikasi bakteri *S. aureus*. (A) Koloni bakteri *S. aureus* pada medium VJA tampak koloni warna hitam, dan medium sekitar koloni kuning. (B) Pengujian katalase menggunakan reagen  $H_2O_2$  muncul gelembung udara. (C) Pengujian koagulase menggumpalkan plasma.

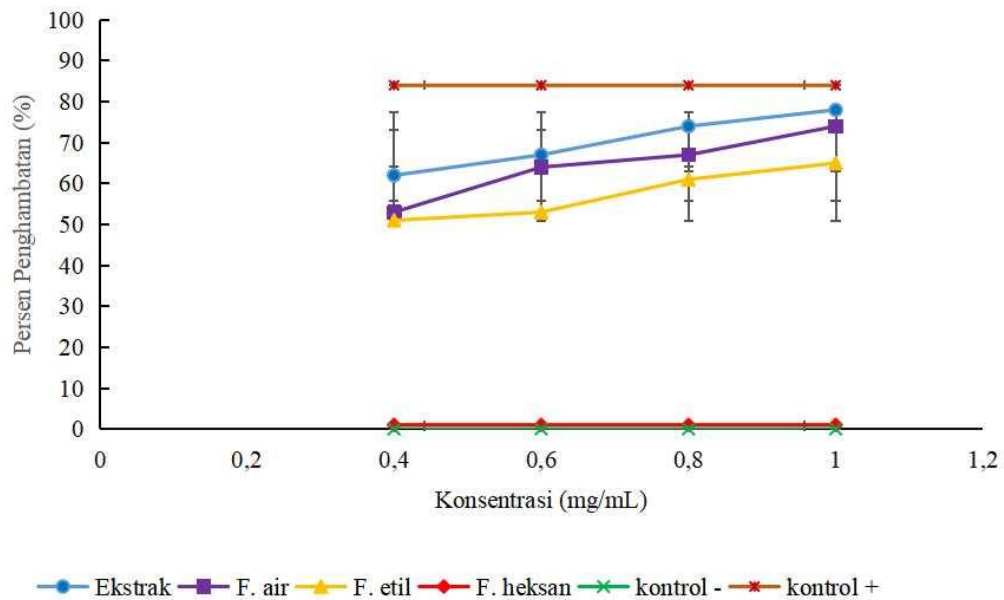
Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm terlihat pada Tabel 4, panjang gelombang yang paling optimal dalam membaca biofilm adalah 595nm yang ditunjukkan dengan nilai OD terbesar pada setiap pembacaan. Panjang gelombang inilah yang akan digunakan dalam pembacaan biofilm bakteri uji pada *microplate reader*. Terlihat juga bahwa *S. aureus* ATCC 25923 memiliki waktu pertumbuhan optimal pada hari ke-3 dengan rata-rata nilai OD sebesar 0,505. Waktu tersebut menjadi waktu optimal pertumbuhan biofilm yang kemudian digunakan sebagai masa inkubasi dalam pengujian aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dan degradasi biofilm pada masing-masing bakteri tersebut.

**Tabel 4.** Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm *S. aureus* dan pencarian panjang gelombang optimum untuk pengukuran biofilm.

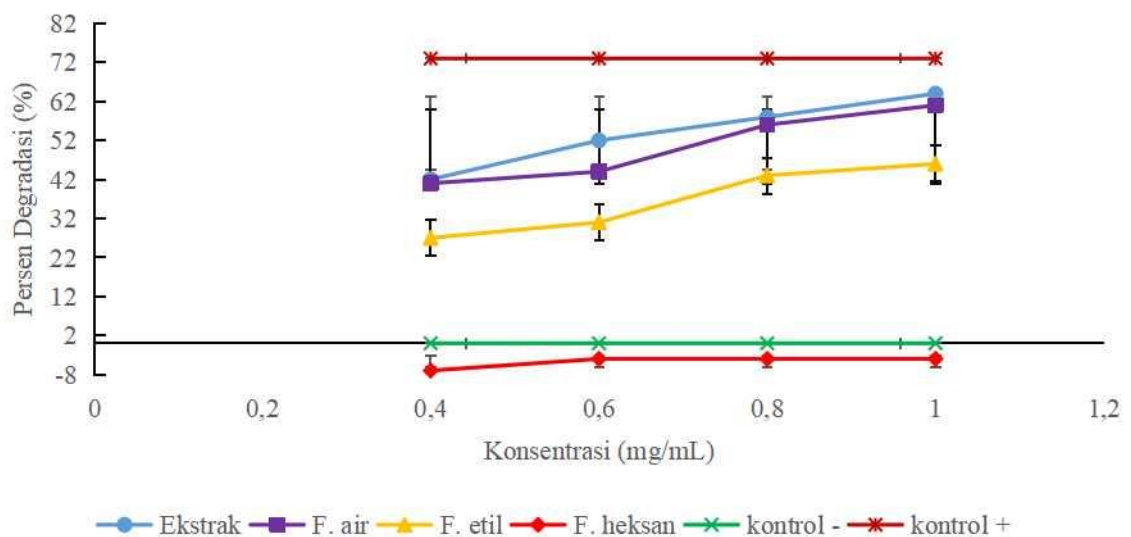
Panjang gelombang	1 hari	2 hari	3 hari	4 hari
490 nm	$0,050 \pm 0,005$	-	$0,094 \pm 0,006$	-
595 nm	$0,056 \pm 0,003$	$0,340 \pm 0,041$	$0,505 \pm 0,110$	$0,443 \pm 0,063$
655 nm	$0,050 \pm 0,003$	-	$0,067 \pm 0,002$	-

Hasil persen penghambatan dan degradasi biofilm perlakuan ekstrak, raksi air, etil asetat, n-heksan, kontrol negatif dan kontrol positif (ciprofloksasin) dilihat pada Gambar 2 dan 3. Hasil menunjukkan semakin besar konsentrasi, semakin besar persentase penghambatan dan degradasi yang dihasilkan. Peningkatan konsentrasi berbanding lurus dengan peningkatan jumlah senyawa bioaktif sehingga semakin besar pula aktivitas sampel dalam menghambat dan mendegradasi biofilm. Ekstrak etanol pada tiap konsentrasi memiliki persentase penghambatan

dan degradasi biofilm terbesar terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dari pada fraksi air, etil asetat dan n-heksan tetapi tidak lebih besar dari kontrol positif (ciprofloxacin). Fraksi n-heksan dapat dikatakan tidak memiliki daya hambat dan degradasi terhadap biofilm *S. aureus* ATCC 25923. Peneliti mengasumsikan bahwa fraksi n-heksan tidak mengandung senyawa bioaktif yang berkhasiat antibiofilm seperti yang telah dilakukan pada identifikasi kandungan senyawa sebelumnya. Asumsi lainnya adalah kadar senyawa bioaktif dalam fraksi n-heksan sangat sedikit sehingga fraksi n-heksan tidak dapat berkhasiat sebagai antibiofilm.



**Gambar 2.** Kurva penghambatan pembentukan (%) biofilm *S. aureus* ATCC 25923 yang diberikan perlakuan ekstrak, raksi air, etil asetat, n-heksan, kontrl negatif dan kontrol positif.



**Gambar 3.** Kurva % degradasi biofilm *S. aureus* ATCC 25923 yang diberikan perlakuan ekstrak, fraksi air, etil asetat, n-heksan, kontrl negatif dan kontrol positif.

Peroleh rata-rata persen penghambatan dan degradasi biofilm dari masing-masing sampel kemudian dilanjutkan dengan penentuan nilai IC<sub>50</sub> dari kedua parameter tersebut. Penentuan IC<sub>50</sub> menggunakan persamaan garis regresi linear antara masing-masing persen penghambatan dan degradasi biofilm dengan konsentrasi ekstrak dan fraksi-fraksi untuk melihat hubungan antara konsentrasi dengan persen penghambatan dan degradasi biofilm dalam menghambat dan mendegradasi 50% biofilm. Hasil perhitungan IC<sub>50</sub> ekstrak ethanol, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan pada parameter uji penghambatan biofilm *S. aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada Tabel 5. Nilai IC<sub>50</sub> yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak ethanol pada uji aktivitas penghambatan dan degradasi biofilm memiliki nilai IC<sub>50</sub> terkecil dari pada fraksi air, etil asetat dan n-heksan.

**Tabel 5.** Hasil IC<sub>50</sub> penghambatan pembentukan biofilm dan degradasi biofilm terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Keterangan: Berbeda bermakna terhadap kelompok ekstrak ethanol <0,05 (a), berbeda bermakna terhadap kelompok fraksi air <0,05 (b), berbeda bermakna terhadap kelompok fraksi etil asetat < 0,05 (c) dan berbeda bermakna terhadap kelompok n-heksan < 0,05 (d).

Sampel	Penghambatan pembentukan biofilm		Degradasi biofilm	
	Persamaan regresi linear	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	Persamaan regresi linear	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
Ekstrak ethanol	$y = 2,75x + 51$	-0,4 <sup>bcd</sup>	$y = 3,6x + 28,8$	5,9 <sup>bcd</sup>
Fraksi air	$y = 3,3x + 41,4$	2,6 <sup>acd</sup>	$y = 3,6x + 25,3$	6,9 <sup>acd</sup>
Fraksi etil asetat	$y = 2,5x + 40$	4,0 <sup>abd</sup>	$y = 3,45x + 12,6$	10,8 <sup>abd</sup>
Fraksi n-heksan	$y = 1x$	50 <sup>abc</sup>	$y = 0,45x - 7,9$	128,7 <sup>abc</sup>

Senyawa antibiofilm dapat juga diperoleh dari bahan alam, salah satunya adalah biji pinang (*Arecha catechu* L.). Senyawa yang dapat disari dari biji pinang antara lain flavonoid dan tanin. Flavonoid diketahui memiliki gugus hidroksil yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga menyebabkan perubahan struktur protein dan asam nukleat. Perubahan struktur tersebut dapat menyebabkan protein penyusun EPS dan biofilm terdegradasi (Kining *et al.*, 2016). Mayoritas senyawa yang teridentifikasi sebagai inhibitor QS adalah flavon seperti furanon (Lahiri *et al.*, 2019). Inhibitor QS bekerja dengan menghambat produksi faktor virulensi, menghambat senyawa efektif sistem QS dan menghambat reseptor sistem sehingga dapat mencegah penempelan dan menghambat pertumbuhan biofilm QS (Refi, 2016). Tanin dan flavonoid bekerja dengan mengikat salah satu protein adhesin bakteri yang dipakai sebagai reseptor permukaan bakteri sehingga terjadi penurunan daya perlekatan bakteri serta penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel. Tanin dan flavonoid juga berpotensi menghambat pertumbuhan biofilm karena dapat menghambat gen *icaA* dan *icaD*. Gen ini dapat mensintesis PIA yang mempunyai peranan penting dalam agregasi sel dan pembentukan EPS *S. aureus*. Kandungan tanin dan flavonoid

dalam ekstrak diduga dapat menghambat pertumbuhan biofilm melalui aktivitasnya sebagai antibakteri dan kemampuannya menghambat pembentukan EPS dengan menghambat pembentukan gen penyandi PIA (Kining *et al.*, 2016).

#### 4. Kesimpulan

Pengujian antibiofilm ekstrak dan fraksi air, etil asetat, n-heksan, kontrol negatif dan kontrol positif dari biji pinang terhadap bakteri yang dapat membentuk biofilm yaitu *S. aureus* telah dilakukan dan diperoleh hasil jika dibandingkan antara ekstrak dan fraksi, maka ekstrak etanol yang memiliki persen penghambatan dan degradasi yang lebih besar. Namun jika dibandingkan antar fraksi, maka fraksi dengan yang kepolaran tinggi yaitu air yang lebih tinggi aktivitas antibiofilmnya. Fraksi n-heksan dapat dikatakan tidak dapat menghambat dan mendegradasi biofilm pada *S. aureus*. Perbedaan terjadi karena kemampuan senyawa metabolit sekunder yang terambil pada masing-masing pelarut beraktivitas sebagai antibiofilm berbeda.

#### Ucapan Terimakasih

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi atas kesempatan melakukan penelitian.

#### Deklarasi Konflik Kepentingan

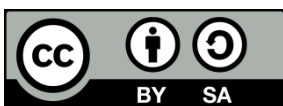
Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini.

#### Daftar Pustaka

- Agustie, A.W.D. dan Samsumaharto, R.A. (2013). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Maserasi Daun Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Biomedika*, 6(2): Hal.14-19.
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., dan Shirtliff, M.E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. Sep-Oct; 2(5):445-59.
- Asahi, Y., Noiri, Y., Miura, J., Maezono, H., Yamaguchi, M., Yamamoto, R., Azakami, H., Hayashi, M., dan Ebisu, S. (2014). Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of applied microbiology*, 116(5), 1164–1171.
- BPOM. (2019). *Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 32 Tahun 2019 tentang Persyaratan Keamanan dan Mutu Obat Tradisional*. Jakarta: BPOM.
- Endarini, LH. (2016). *Farmakognosi dan Fitokimia*. Jakarta: Pusdik SDM Kesehatan.
- Faden, A. A. (2018). Evaluation of Antibacterial Activities of Aqueous and Methanolic Extracts of *Areca Catechu* Against Some Opportunistic Oral Bacteria. *Biosci Biotech Res Asia*; 15(3).
- Gunardi, W.D. (2014) *Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi*. Jakarta: Universitas Kristen Krida Wacana, 1, Hal.1-9.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg's. (2016). *Medical Microbiology, Twenty-Seventh Edition*. McGraw-Hill Education: New York.

- Joshi, M., Kavita, G., Sneha, M., dan Sneha, S. (2012). Pharmacological Investigation of *Areca Catechu* Extracts for Evaluation of Learning, Memory and Behavior in Rats. *Int Curr Pharma J*, 1(6), 128-132.
- Kementrian Kesehatan RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia Suplemen II*. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.
- Kementrian Kesehatan RI. (2020). *Farmakope Indonesia. Edisi VI*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kining, E., Syamsul, F., dan Novik, N. (2016). Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Air Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*. *Current Biochemistry*. 2(3): Hal.150-163.
- Klein, M.H.F., Santos, M.J.C., Klein, R.C., De Souza, G.N. dan Ribon, A.D.O.B. (2015). An Association between Milk and Slime Increases Biofilm Production by bovine *Staphylococcus aureus*. *BMC Vet Res*, 11(3), 1-8.
- Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., dan Nag, M. (2019). Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *Journal of biosciences*, 44(2), 52.
- Lee, J.H., Park, H., Cho, H.S., Joo, S.W., Cho, M.W., dan Lee, J. (2013). Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*, *Biofouling*, 29(5), 491-499.
- McMurry, J. E. (2012). *Organic Chemistry 8th Edition*, Boston: Brooks/Cole Cengage Learning, Boston.
- Memariani, H., Memariani, M., & dan Ghasemian, A. (2019). An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(9), 143.
- Nurhayati, T, D. Aryanti, dan Nurjanah. (2009). Kajian Awal Potensi Ekstrak Spons Sebagai Antioksidan. *Jurnal Kelautan Nasional*. 2(2):43-51.
- Peng, W., Liu, Y. J., Wu, N., Sun, T., He, X. Y., Gao, Y. X., dan Wu, C. J. (2015). *Areca catechu* L. (Arecaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of ethnopharmacology*, 164, 340–356.
- Rachmawati, S., Fazeri, R. L. dan Ika, N. (2020). Gambaran Penggunaan Antibiotik di Bangsal Penyakit Dalam RSUD Bangil Kabupaten Pasuruan. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 6(1), 12-21.
- Refi, M.R. (2016). Antimicrobial, Anti-Biofilm, Anti-Quorum Sensing and Synergistic Effects of Some Medicinal Plants Extract (*Thesis of Master of Biological Science/Medical Technology*), Gaza: The Islamic University.
- Sa'dah, H dan Henny, N. (2015). Perbandingan Pelarut etanol dan Air pada Pembuatan Ekstrak Umbi Bawang Tiwai (*Eleutherine americana* merr.) Menggunakan Metode Maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 1(2): Hal.149-153.
- Shamim, S. dan Maryam, K. (2017). Phytochemical Screening by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) And Antimicrobial Activity of Different Solvent Fractions of *Areca Nuts* Against *Bacillus Subtilis* Biofilm. *Int. Res. J. Pharm*, 8(10): Hal.29-37.
- Shen, X., Chen, W., Zheng, Y., Lei, X., Tang, M., Wang, H., dan Song, F. (2017), Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of

- Areca catechu* L. and *Cocos nucifera* L., *Industrial Crops and Products*, 96, Pages 110-119.
- Vastrad, V. J., Goudar, G., A. Byadgi, S., dan Bhairappannavar, S. D. (2021). *Areca catechu* Slurry: A Rich Source of Phenolics and Flavonoids. *Asian Journal of Chemistry*, 33(2), 271-275.
- Vinay, S.P.; dan Chandrasekhar, N. (2019). Facile Green Chemistry Synthesis of Ag Nanoparticles Using *Areca catechu* Extracts for the Antimicrobial Activity and Photocatalytic Degradation of Methylene Blue Dye. *Materials Today: Proceedings*, 9(3), 499–505.
- Wang, R., Pan, F., He, R., Kuang, F., Wang, L., dan Lin, X. (2021). Arecanut (*Areca catechu* L.) seed extracts extracted by conventional and eco-friendly solvents: Relation between phytochemical compositions and biological activities by multivariate analysis. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 25, 100336.
- Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K., dan Bakhrouf, A. (2010). A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *The new microbiologica*, 33(2), 137–145.



© 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International (CC BY-SA 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)