

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang *Jatropha multifida* L. terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA

The Bactericidal and Antibiofilm Activity of Stem Bark of *Jatropha multifida* L. Against *Staphylococcus aureus* and MRSA

Annisa Fitria^{*}, Arde Toga Nugraha, Yurfida Meliani, Achdiani Choiriah

Prodi Farmasi FMIPA Universitas Islam Indonesia
Jl. Kaliurang KM 14,5 Kampus Terpadu, Sleman, Yogyakarta
Corresponding author: email: annisa.fitria@uii.ac.id

ABSTRACT

Chronical wound often caused by bacteria which has antibiotic resistance characteristic and presence of biofilm formation. This study aims to evaluate the bactericidal and antibiofilm activity of stem bark of *Jatropha multifida* L. against *Staphylococcus aureus* and MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), as alternative antimicrobial agents. Examination of bactericidal activity of the extract was performed by time-kill assay to determine the speed of the extract to eradicate bacteria. The inhibitory activity of extract toward biofilm production was quantified using spectrophotometric method. The extract showed bactericidal activity which can be achieved at 8 hours and 12 hours against *Staphylococcus aureus* and MRSA in MBC value of 0.5 mg/mL and 1 mg/mL. The extract exhibited antibiofilm activity which indicates by its IC₅₀ value of 0.3 mg/mL and 0.76 mg/mL against *Staphylococcus aureus* and MRSA. These experiments have shown the potential of the extract of *Jatropha multifida* L. stem bark as a bioactive substance in a topical agent for chronical skin infection.

Keywords: *Jatropha multifida* L., time-kill assay, antibiofilm

ABSTRAK

Kasus infeksi luka kronis pada umumnya disebabkan oleh bakteri yang resisten terhadap antibiotik serta memiliki kapasitas untuk memproduksi biofilm. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas bakterisidal dan antibiofilm batang *Jatropha multifida* L. sebagai sumber alternatif agen antibakteri, terhadap mikroba penyebab infeksi luka kronis yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Pengujian aktivitas bakterisidal ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode *time-kill assay* untuk menentukan kecepatan daya bunuh ekstrak. Aktivitas penghambatan biofilm ekstrak dihitung secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri. Ekstrak diketahui menghasilkan aktivitas bakterisidal yang dapat dicapai pada jam ke-8 dan jam ke-12, dengan KBM masing-masing sebesar 0,5 mg/mL dan 1 mg/mL terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA. Ekstrak menunjukkan penghambatan biofilm dengan nilai IC₅₀ sebesar 0,3 mg/mL terhadap *Staphylococcus aureus* dan 0,76 mg/mL terhadap MRSA. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak batang *Jatropha multifida* L. berpotensi untuk dapat dikembangkan menjadi bahan baku sediaan topikal untuk mengatasi infeksi luka kronis.

Kata kunci: *Jatropha multifida* L., time-kill assay, antibiofilm

*Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang *Jatropha multifida* L. terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA*

Pendahuluan

Pengobatan penyakit infeksi luka kronis menggunakan antibiotik mengalami penurunan efikasi akibat resistensi bakteri. Penurunan tingkat efisiensi antibiotik yang disebabkan oleh bakteri resisten menjadi masalah klinis yang serius pada pengobatan luka kronis seperti yang terjadi pada luka diabetik. Infeksi luka kronis seperti yang terjadi pada kasus luka diabetik dapat mengakibatkan amputasi sehingga dapat menurunkan kualitas hidup pasien serta dapat menyebabkan kematian (Chammas *et al.*, 2016). Insidensi kasus tersebut semakin meningkat terutama pada negara berkembang yang masih memiliki kekurangan dalam penyediaan fasilitas kesehatan baik yang terkait dengan proses diagnosa penyakit infeksi maupun penanganan terapi pada pasien (Crevel *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri patogen yang ditemukan secara dominan pada kasus luka kronis. MRSA (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) merupakan salah satu strain *S. aureus* isolat klinis yang ditemukan pada jaringan kulit pasien yang diketahui telah resisten terhadap metisilin (Smith *et al.*, 2017). Strain bakteri patogen yang tidak lagi sensitif terhadap pemaparan antibiotik menimbulkan kegagalan terapi infeksi. Selain itu diketahui pula bahwa *S.*

aureus yang berhasil diisolasi dari jaringan kulit, terutama yang bersifat resisten terhadap antibiotik seperti MRSA, memiliki potensi yang lebih tinggi untuk memproduksi biofilm dibandingkan isolat yang terdapat pada bagian tubuh lainnya termasuk darah (Belbase *et al.*, 2017). Biofilm merupakan kumpulan sel-sel mikroba yang melekat pada suatu permukaan yang terbungkus dalam suatu matriks *extracellular polymeric substances* (EPS) yang diproduksi oleh mikroorganisme tersebut. Biofilm merupakan faktor virulensi mayor yang berkontribusi pada infeksi luka kronis. Bakteri yang berada dalam biofilm mampu bertahan terhadap antibiotik, karena antibiotik tersebut gagal untuk dapat berpenetrasi menembus biofilm. Hal tersebut menyebabkan eradikasi bakteri menjadi terhambat sehingga jaringan kulit yang mengalami infeksi sulit untuk disembuhkan. Selain itu proses reepitalisasi jaringan kulit terhambat akibat keberadaan biofilm yang berkembang pada jaringan tersebut (Schierle *et al.*, 2009).

Resistensi antibiotik dapat diatasi dengan mengupayakan penemuan agen antibakteri baru dari sumber daya alam. Agen antibakteri dapat bekerja, baik melalui mekanisme penghambatan aktivitas sel, penghancuran sel maupun

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang Jatropha multifida L. terhadap Staphylococcus aureus dan MRSA

dengan penghambatan secara spesifik pada produksi faktor virulensi seperti biofilm. Ekstrak maupun senyawa bioaktif tunggal yang berasal tumbuhan obat telah terbukti menghasilkan berbagai macam metabolit sekunder yang bertindak sebagai agen antimikroba dan inhibitor produksi berbagai faktor virulensi bakteri seperti biofilm (Morán *et al.*, 2017).

Jatropha multifida L. merupakan spesies dari keluarga *Euphorbiaceae*, yang sering digunakan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan penyakit infeksi pada kulit dengan penggunaan batang tumbuhan tersebut secara topikal (Sabandar *et al.*, 2013). Bagian batang *J. multifida* L. menghasilkan aktivitas antibakteri yang relatif tinggi terhadap beberapa bakteri patogen dibandingkan dengan bagian tumbuhan lainnya (Aiyelaagbe *et al.*, 2008). Hal tersebut membuktikan bahwa batang *J. multifida* memiliki potensi untuk dapat dikembangkan sebagai sumber senyawa antibakteri. Meskipun telah terdapat penelitian yang dilakukan untuk menguji aktivitas antimikroba dan antiparasit batang *J. multifida* L., namun belum ada penelitian yang menyebutkan aktivitas antibiofilm serta mengevaluasi kemampuan bunuh ekstrak atau senyawa bioaktif tunggal tumbuhan tersebut terhadap bakteri patogen penyebab infeksi kulit (Falodun *et al.*, 2014). Evaluasi

aktivitas antibakteri serta penghambatan produksi biofilm dari *J. multifida* L. penting untuk dilakukan agar dapat mengeksplorasi potensi tumbuhan tersebut sebagai sumber senyawa antibakteri sehingga dapat dikembangkan menjadi bahan baku sediaan topikal yang dapat digunakan untuk pengobatan infeksi luka kronis.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan antara lain *rotary evaporator* (Heidolph), seperangkat alat sokhletasi, *microplate reader* (Bio-Rad), *biosafety cabinet* (ESCO, Class II BSC), *colony counter* (Scan 500, Interscience), inkubator (Mermert), autoklaf (All American), mikropipet (Brand), timbangan analitik (Mettler Toledo), serta berbagai peralatan gelas (Pyrex).

Simplisia kering serbuk batang *J. multifida* L. diperoleh dari C.V Merapi Farma, Sleman, Yogyakarta dengan menggunakan tanaman yang telah dideterminasi di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Pelarut sokhletasi yang digunakan antara lain n-heksan dan etil asetat dan yang berderajat teknis. Bahan yang digunakan untuk pengujian mikrobiologi yaitu *Staphylococcus aureus*

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang Jatropha multifida L. terhadap Staphylococcus aureus dan MRSA

ATCC 25923 dan MRSA yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Nutrien Agar dan Mueller Hinton Broth (Oxoid), DMSO, NaCl 0,9% steril, *McFarland 0,5*, ampicilin, siprofloksasin dan cefoxitim (Sigma).

Prosedur Kerja

Ekstraksi Batang *J. multifida* L.

Serbuk simplisia kering batang *J. multifida* sebesar 300 gr disokhletasi menggunakan n-heksan sebanyak 1,5 L. Setelah disokhletasi, ampas yang dihasilkan dikeringanginkan sampai terbebas bau n-heksan. Ampas kemudian dilanjutkan disokhletasi menggunakan etil asetat. Filtrat yang dikumpulkan, kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak kemudian dikeringkan pada suhu ruang menggunakan desikator, kemudian disimpan pada suhu 4°C.

Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Nilai KHM dan KBM ekstrak ditentukan dengan metode mikrodilusi, sesuai dengan metode yang ditetapkan oleh *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)* (M. P. Weinstein, 2012). Ekstrak diencerkan menggunakan media MHB

dengan 2 kali pengenceran sehingga didapatkan seri konsentrasi sebesar 1 mg/mL-0,012 mg/mL dengan volume pada tiap sumuran *microplate* sebesar 100µL. Inokulum dengan jumlah bakteri 10⁶ CFU/ mL sebanyak 10 µL, ditambahkan pada tiap sumuran yang telah diisi media dan ekstrak. Dalam pengujian ini digunakan kontrol bakteri yakni sumuran yang berisi MHB, DMSO 10% dan bakteri uji serta kontrol media yakni sumuran yang berisi MHB tanpa inokulum bakteri. Kontrol antibiotik yang digunakan adalah ampicilin dan siprofloksasin. Kultur tersebut kemudian diinkubasi secara aerobik pada suhu 37°C selama 24 jam. KHM ditentukan sebagai konsentrasi ekstrak yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri (jernih) bila dibandingkan dengan kontrol (keruh). Sampel dari beberapa sumuran yang diduga menghasilkan nilai KHM tersebut kemudian dikulturkan pada MHA untuk menentukan KBM. KBM dapat ditetapkan jika tidak ditemukan koloni bakteri hidup pada media agar. Percobaan ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

Time-kill Assay

Pengujian ini dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan (Belley *et al.*, 2008) dengan sedikit modifikasi Dalam erlenmeyer dimasukkan

*Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang *Jatropha multifida* L. terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA*

kultur mikroba uji dengan nilai akhir 10^6 CFU/mL, ekstrak dengan konsentrasi tertentu dan MHB 10 mL. Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam *incubator shaker*. Pada percobaan ini disusun variasi perlakuan dengan menambahkan ekstrak pada tiap erlenmeyer dengan variasi konsentrasi yakni sebesar 1/2 KHM, KHM, dan 2 KHM. Kontrol terdiri dari kultur bakteri dan DMSO 10% yang diinkubasi dengan kondisi yang sama. Sampel sebanyak 0,1 mL diambil setiap dua jam (0, 2, 4, 6, 8,10,12, dan 24 jam) baik dari kultur kontrol maupun kultur dari tiap perlakuan. Sampel ini kemudian diinokulasikan dengan metode *pour plate* dengan menggunakan MHA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni bakteri yang tumbuh dihitung dengan *colony counter* kemudian ditentukan jumlahnya dalam nilai logaritmik (\log_{10} CFU/ml). Eksperimen ini dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Jumlah bakteri yang berhasil dibunuh oleh ekstrak dalam rentang waktu tertentu dapat ditentukan dari nilai *log kill*. Nilai tersebut diperoleh dengan cara menghitung selisih antara jumlah bakteri kontrol dengan jumlah bakteri sampel dari masing-masing perlakuan tiap dua jam. Aktivitas bakterisidal dapat ditetapkan jika nilai *log kill* mencapai $>3\log_{10}$ CFU/mL.

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang Jatropha multifida L. terhadap Staphylococcus aureus dan MRSA

Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Eksperimen ini dilakukan berdasarkan metode yang dideskripsikan oleh (Liu *et al.*, 2015). Bakteri uji dikulturkan dalam tabung reaksi yang mengandung 3 mL MHB dan glukosa 1%, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Sebanyak 20 μL kultur bakteri (10^8 CFU/mL) dan ekstrak dengan konsentrasi tertentu sebanyak 20 μL ditambahkan pada sumuran *micoplate* yang telah diisi dengan 180 μL MHB. Pada pengujian ini disusun variasi perlakuan dengan menambahkan ekstrak pada tiap sumuran dengan variasi konsentrasi yakni sebesar KHM, 1/2 KHM, 1/4 KHM dan 1/8 KHM. Sumuran yang mengandung kultur bakteri tanpa ekstrak digunakan sebagai kontrol. Kultur tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi seluruh cairan dalam sumuran dibuang, kemudian *microplate* dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS 300 μL (pH 7,2) selanjutnya ditiriskan dan didiamkan mengering pada suhu kamar. Larutan kristal violet 0,5% sebanyak 150 μL ditambahkan ke dalam masing-masing sumuran. Setelah 15 menit, semua larutan pada sumuran dibuang, kemudian ditambahkan 200 μL etanol untuk melarutkan kristal violet yang mewarnai

biofilm. Absorbansi larutan diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm sesuai dengan serapan maksimum kristal violet. Percobaan ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak enam kali. Presentase penghambatan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Abs. kontrol} - \text{Abs. perlakuan}}{\text{Abs. kontrol}} \times 100\% \quad \dots(1)$$

Hasil dan Pembahasan

Penentuan KHM dan KBM

Nilai KHM diperlukan sebagai acuan untuk melakukan *time-kill assay* dan uji antibiofilm. Hasil penentuan KHM dan KBM ekstrak terhadap bakteri uji tercantum pada Tabel 1. Ekstrak etil asetat menghasilkan aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap *S. aureus* dan MRSA dengan nilai KHM masing-masing sebesar 0,25 mg/mL dan 0,5 mg/mL. Ekstrak suatu tanaman dapat dinyatakan menghasilkan aktivitas antibakteri jika diperoleh nilai KHM dibawah 1 mg/mL (Ríos & Recio, 2005). Meskipun ekstrak diketahui memiliki aktivitas antibakteri, namun berdasarkan pengujian yang telah dilakukan aktivitas antibakteri ekstrak relatif lebih rendah jika dibandingkan dengan antibiotik. Perbedaan aktivitas tersebut dapat disebabkan karena ekstrak mengandung campuran senyawa yang

dapat mempengaruhi aktivitas yang dihasilkan. Kandungan senyawa dalam ekstrak mempengaruhi aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Pada beberapa penelitian lain terkait *J. multifida* L. telah dibuktikan bahwa penggunaan etil asetat sebagai pelarut dapat menghasilkan aktivitas antibakteri paling tinggi dibandingkan dengan pelarut lain. Hal tersebut menunjukkan bahwa etil asetat memiliki kemampuan yang paling baik dalam mengekstraksi senyawa antibakteri dari tanaman tersebut (Rampadarath, *et al.*, 2014).

Penentuan Aktivitas Bakterisidal

Penentuan aktivitas bakterisidal atau daya bunuh suatu agen antibakteri diperlukan untuk mengetahui efektivitas suatu agen antibakteri terhadap bakteri patogen. Kemampuan antibakteri yang dihasilkan ekstrak tanaman dapat bervariasi yakni dapat bersifat bakteriostatik atau bakterisidal (Olajuyigbe & Afolayan, 2012; Nuryanti *et al.*, 2014). Oleh karena itu diperlukan *time-kill assay* untuk mengevaluasi karakteristik aktivitas antibakteri yang dihasilkan ekstrak *J. multifida* L.

Evaluasi daya bakterisidal ekstrak etil asetat disajikan pada Gambar 1. Berdasarkan kurva tersebut diperlihatkan bahwa *J. multifida* menghasilkan daya bakterisidal yang aktivitasnya tergantung

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang Jatropha multifida L. terhadap Staphylococcus aureus dan MRSA

dari konsentrasi ekstrak serta waktu inkubasi. Ekstrak menghasilkan kecepatan bunuh yang berbeda terhadap masing-masing strain bakteri. *S. aureus* berhasil dieradikasi dari kultur setelah dipapar oleh ekstrak selama 8 jam sedangkan MRSA hal tersebut terjadi pada jam ke-12. Eradikasi bakteri ditandai dengan sama sekali tidak ditemukannya koloni bakteri yang hidup pada kultur. Ekstrak membutuhkan waktu yang relatif lebih lama dibandingkan isolat atau senyawa tunggal dalam mengeradikasi bakteri secara keseluruhan karena mengandung campuran senyawa yang dapat mempengaruhi aktivitas (Tyagi *et al.*, 2015).

Berdasarkan hasil perhitungan nilai log *kill* yang tersaji pada Tabel 2., dapat disimpulkan bahwa bakteri *S. aureus* dan MRSA hanya dapat dibunuh pada konsentrasi ekstrak dengan nilai 2 KHM yang ditandai dengan nilai log *kill* sebesar log 3,3 pada *S. aureus* dan log 4,1 pada MRSA. Pada pemaparan ekstrak sebesar ½ KHM dan KHM tidak ditemukan aktivitas bakterisidal pada kedua strain bakteri tersebut sampai pada jam ke-24. Meskipun demikian, jumlah koloni yang berhasil dihitung pada pemaparan ekstrak dengan nilai KHM menunjukkan jumlah bakteri yang lebih rendah dibanding jumlah bakteri pada kontrol (log *kill* >1). Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak menghasilkan

efek penghambatan pertumbuhan bakteri pada nilai KHM. Ekstrak dengan nilai ½ KHM tidak menunjukkan jumlah bakteri yang lebih rendah dibanding jumlah bakteri pada kontrol, sehingga dapat disimpulkan tidak terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri saat bakteri dipaparkan dengan ekstrak pada konsentrasi dibawah nilai KHM.

Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa kandungan senyawa dalam ekstrak *J. multifida* L. menghasilkan aktivitas bakterisidal atau kematian sel terhadap bakteri *S. aureus* dan MRSA. Kesimpulan ini didukung oleh hasil dari beberapa penelitian lain yang membuktikan bahwa senyawa tunggal yang berhasil diisolasi dari *J. multifida* L. menunjukkan aktivitas sitotoksik sehingga menyebabkan kematian sel. Beberapa senyawa bioaktif tersebut diketahui termasuk dalam golongan diterpenoid (Das *et al.*, 2009; Kanth *et al.*, 2011; Falodun *et al.*, 2014). Beberapa senyawa diterpenoid diperkirakan memiliki mekanisme aksi yang bervariasi tergantung dari struktur dan gugus fungsi pada senyawa tersebut, namun demikian senyawa diterpenoid pada umumnya memiliki kemampuan untuk berinteraksi dengan membran sel sehingga menyebabkan lisis sel (Urzúa *et al.*, 2008).

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang Jatropha multifida L. terhadap Staphylococcus aureus dan MRSA

Penentuan Aktivitas Antibiofilm

Aktivitas pembentukan biofilm pada umumnya ditentukan dengan menggunakan konsentrasi ekstrak dibawah nilai KHM. Hal tersebut dimaksudkan agar bakteri masih mengalami pertumbuhan sehingga dapat memproduksi biofilm. Dengan demikian pengaruh ekstrak terhadap pembentukan biofilm dapat diamati dan dapat ditentukan nilai penghambatannya.

Efek penghambatan biofilm bakteri oleh ekstrak etil asetat *J. multifida* ditemukan dalam penelitian ini. Aktivitas ekstrak terhadap pembentukan biofilm bakteri dapat diamati dengan membandingkan nilai absorbansi antara sampel perlakuan dengan kontrol. Berdasarkan Gambar 2. dapat diperlihatkan bahwa ekstrak mampu menurunkan massa biofilm baik pada bakteri *S. aureus* maupun MRSA. Sesuai dengan yang dipaparkan pada Tabel 3. diketahui bahwa ekstrak dapat menghambat produksi biofilm bakteri dengan nilai <50% pada pemaparan ekstrak sebesar $\frac{1}{2}$ KHM. Hasil tersebut serupa dengan perhitungan IC_{50} yang menunjukkan nilai sebesar 0,3 mg/mL dan 0,76 mg/mL, yang berada diatas nilai KHM (0,25 mg/mL dan 0,5 mg/mL) pada masing-masing bakteri uji. Berdasarkan hasil tersebut, maka ekstrak dapat dinyatakan menghasilkan aktivitas antibiofilm yang

moderat. Aktivitas antibiofilm yang tergolong kuat terdapat pada ekstrak tumbuhan yang menghasilkan penghambatan produksi biofilm >50% dengan pemaparan ekstrak dibawah nilai KHM (Dwivedi & Singh, 2015; Teanpaisan *et al.*, 2016). Beberapa jenis golongan senyawa dalam tumbuhan diketahui dapat menghasilkan aktivitas antibiofilm bakteri dengan cara menekan ekspresi gen yang menyandi protein dan enzim yang digunakan untuk membentuk biofilm (Ta & Arnason, 2016).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian diketahui bahwa *J. multifida* L. menghasilkan aktivitas bakterisidal dan antibiofilm terhadap bakteri *S. aureus* maupun strain bakteri *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik metisilin (MRSA). Hal tersebut juga menunjukkan bahwa *J. multifida* berpotensi untuk dikembangkan menjadi sediaan topikal yang dapat diaplikasikan untuk pengobatan luka kronis.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih ditujukan kepada pihak DPPM UII serta skema AIPT atas hibah yang diberikan sehingga seluruh rangkaian penelitian ini dapat dilaksanakan

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang Jatropha multifida L. terhadap Staphylococcus aureus dan MRSA

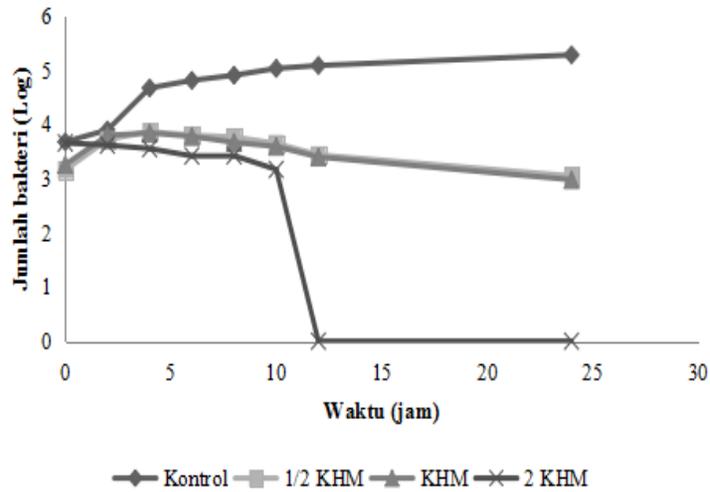
Pustaka

- Aiyelaagbe, O. O. *et al.* (2008) 'The antimicrobial activity of *Jatropha multifida* extracts and chromatographic fractions against sexually transmitted infections', *Journal of Medical Sciences*, pp. 143–147. doi: 10.3923/jms.2008.143.147.
- Belbase, A. *et al.* (2017) 'Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal', *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. BioMed Central, 16(1), p. 15. doi: 10.1186/s12941-017-0194-0.
- Belley, A. *et al.* (2008) 'Assessment by Time-Kill Methodology of the Synergistic Effects of Oritavancin in Combination with Other Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus*', 52(10), pp. 3820–3822. doi: 10.1128/AAC.00361-08.
- Chammas, N. K., Hill, R. L. R. and Edmonds, M. E. (2016) 'Increased Mortality in Diabetic Foot Ulcer Patients: The Significance of Ulcer Type', *Journal of Diabetes Research*. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/2879809.
- Crevel, R. Van, Vijver, S. Van De and Moore, D. A. J. (2016) 'The global diabetes epidemic: what does it mean for infectious diseases in tropical countries?', *THE LANCET Diabetes & Endocrinology*. Elsevier Ltd, 8587(16), pp. 1–12. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30081-X.
- Das, B. *et al.* (2009) 'Multifidone: A novel cytotoxic lathyrane-type diterpene having an unusual six-membered A ring from *Jatropha multifida*', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 19(1), pp. 77–79. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.11.014.
- Dwivedi, D. and Singh, V. (2015) 'Journal of Traditional and Complementary Medicine Effects of the natural compounds embelin and piperine on the bio film-producing property of *Streptococcus mutans*', *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. Elsevier Ltd, (2014), pp. 9–13. doi: 10.1016/j.jtcme.2014.11.025.
- Falodun, A. *et al.* (2014) 'Isolation of antileishmanial, antimalarial and antimicrobial metabolites from *Jatropha multifida*', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(5), pp. 374–378. doi: 10.12980/APJTB.4.2014C1312.
- Kanth, B. S. *et al.* (2011) 'New bioactive macrocyclic diterpenoids from *Jatropha multifida*', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 21(22), pp. 6808–6810. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.09.032.
- Liu, H. *et al.* (2015) 'Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidione derivatives against clinical staphylococcus strains', (November 2014), pp. 1–6. doi: 10.1038/emi.2015.1.
- M. P. Weinstein. (2012) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. doi: 10.4103/0976-237X.91790.
- Morán, A., Gutiérrez, S. and Ferrero, M. A. (2017) 'Non-toxic plant metabolites regulate

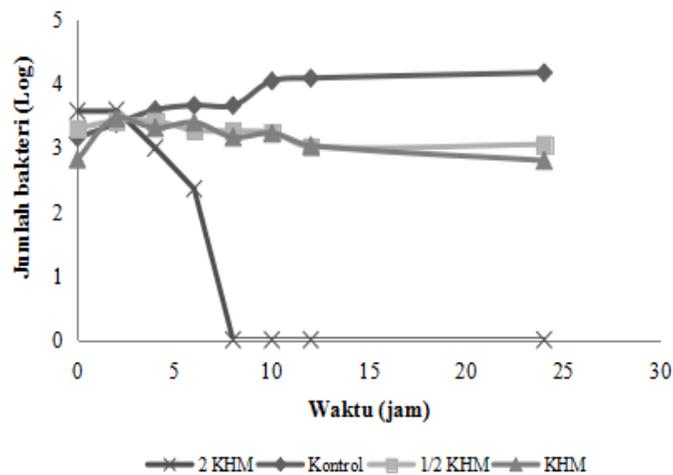
Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang Jatropha multifida L. terhadap Staphylococcus aureus dan MRSA

- Staphylococcus viability and biofilm formation: a natural therapeutic strategy useful in the treatment and prevention of skin infections', 30(10), pp. 1–6.
- Nuryanti, A., Yulinah, E. and Fidrianny, I. (2014) 'Activity of Several Plant Extracts Against Drug-Sensitive and Drug-Resistant Microbes', *Procedia Chemistry*. Elsevier Ltd., 13, pp. 164–169. doi: 10.1016/j.proche.2014.12.021.
- Olajuyigbe, O. O. and Afolayan, A. J. (2012) 'In vitro antibacterial and time-kill assessment of crude methanolic stem bark extract of *Acacia mearnsii* de wild against bacteria in shigellosis', *Molecules*, 17(2), pp. 2103–2118. doi: 10.3390/molecules17022103.
- Rampadarath, S., Puchooa, D. and Ranghoo-Sanmukhiya, V. M. (2014) 'Antimicrobial, phytochemical and larvicidal properties of *Jatropha multifida* Linn.', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(S1), pp. S380–S383. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60262-5.
- Ríos, J. L. and Recio, M. C. (2005) 'Medicinal plants and antimicrobial activity', *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), pp. 80–84. doi: 10.1016/j.jep.2005.04.025.
- Sabandar, C. W. *et al.* (2013) 'Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review', *Phytochemistry*. Elsevier Ltd, 85, pp. 7–29. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.10.009.
- Schierle, C. F. *et al.* (2009) 'Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model', *Wound Repair and Regeneration*, 17(3), pp. 354–359. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00489.x.
- Smith, K. *et al.* (2017) 'Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*', (2008), pp. 1018–1023. doi: 10.1099/jmm.0.2008/000968-0.
- Ta, C. A. K. and Arnason, J. T. (2016) 'Mini review of phytochemicals and plant taxa with activity as microbial biofilm and quorum sensing inhibitors', *Molecules*, 21(1). doi: 10.3390/molecules21010029.
- Teanpaisan, R., Kawsud, P. and Pahumunto, N. (2016) 'Journal of Traditional and Complementary Medicine Screening for antibacterial and antibiotic activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms', *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. Elsevier Ltd, pp. 6–11. doi: 10.1016/j.jtcme.2016.06.007.
- Tyagi, P. *et al.* (2015) 'Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane', pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0121313.
- Urzúa, A. *et al.* (2008) 'A structure-activity study of antibacterial diterpenoids', *Molecules*, 13(4), pp. 882–891. doi: 10.3390/molecules13040822.

LAMPIRAN GAMBAR



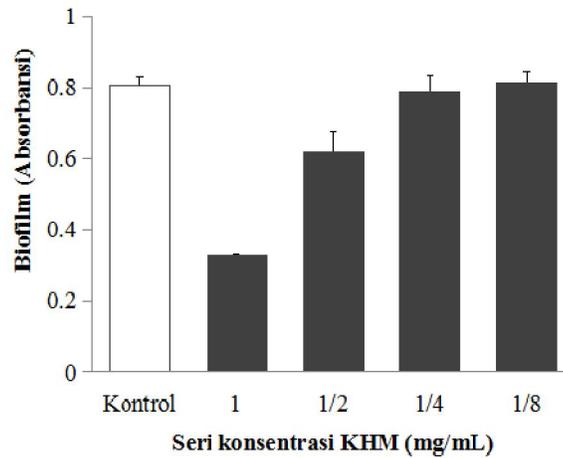
(A)



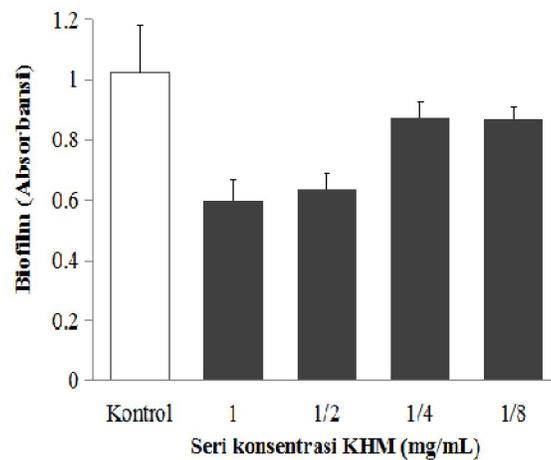
(B)

Gambar 1. Kurva time-kill ekstrak *J. multifida* L. dengan variasi nilai KHM terhadap *S. aureus* (A) dan MRSA (B)

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang *Jatropha multifida* L. terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA



(A)



(B)

Gambar 2. Aktivitas antibiofilm ekstrak *J. multifida* L. dengan variasi seri pengenceran KHM terhadap *S. aureus* (A) dan MRSA (B)

*Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang *Jatropha multifida* L. terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA*

LAMPIRAN TABEL

Tabel 1. KHM dan KBM ekstrak *J. multifida* L. terhadap bakteri uji

Bakteri uji	Ekstrak etil asetat (mg/mL)		Antibiotik (µg/mL)	
	KHM	KBM	KHM	KBM
<i>S. aureus</i>	0,25	0,50	9,76	19,53
<i>MRSA</i>	0,50	1	2,44	4,88

Tabel 2. Nilai *Log Kill* CFU/mL ekstrak *J. multifida* terhadap bakteri uji

Jam ke-	Kontrol	Jumlah koloni (Log CFU/ml)					
		½ KHM	<i>Log Kill</i> ½ KHM	KHM	<i>Log Kill</i> KHM	2 KHM	<i>Log Kill</i> 2 KHM
<i>Staphylococcus aureus</i>							
0	3,42	3,18	0,24	2,38	1,04	3,37	0,05
2	3,02	3,48	-0,46	3,46	-0,44	3,42	-0,4
4	3,16	3,41	-0,25	3,2	-0,04	3,23	-0,07
6	3,49	3,08	0,41	3,05	0,44	2,51	0,98
8	3,3	2,98	0,32	3,16	0,14	0	3,3
10	3,32	3,32	0,09	3,18	0,14	0	3,32
12	3,35	2,94	0,41	2,81	0,54	0	3,35
24	3,67	2,86	0,81	2,51	1,16	0	3,67
<i>MRSA</i>							
0	3,64	3,16	0,48	3,26	0,38	3,38	0,26
2	3,63	4,26	-0,63	3,4	0,23	3,41	0,22
4	4,39	4,20	0,19	3,51	0,88	3,43	0,96
6	4,31	4,24	0,07	3,43	0,88	3,2	1,11
8	4,35	4,21	0,14	3,26	1,09	3,25	1,1
10	4,49	4,17	0,32	3,11	1,38	3,08	1,41
12	4,51	3,83	0,68	3,08	1,43	0	4,51
24	4,58	3,05	1,53	2,98	1,6	0	4,58

Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang Jatropha multifida L. terhadap *Staphylococcus aureus* dan *MRSA*

Tabel 3. Nilai presentase penghambatan biofilm ekstrak *J. multifida* terhadap bakteri uji

Seri konsentrasi	<i>S. aureus</i>	IC ₅₀	<i>MRSA</i>	IC ₅₀
KHM	88,80%	0,3 mg/mL	55,93%	0,76 mg/mL
1/2 KHM	37,72%		45,57%	
1/4 KHM	12,77%		28,27%	
1/8 KHM	0%		13,37%	