
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 microtiter plate assay)

Andi Arjuna, Winda Setya Pratama, Sartini, Mufidah

Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia, 90245

Article Info:

Received: 02 Maret 2018

in revised form: 16 Maret 2018

Accepted: 30 Maret 2018

Available Online: 30 Maret 2018

Keywords:

biofilm

black tea

green tea

microtiter plate

Streptococcus mutans

ABSTRACT

Tea (*Camellia sinensis* L.) has activity as an antibacterial, widely studied to plankton cells, without further researching into biofilm cell. Therefore, this research had been conducted to initially evaluate the activity of green and black tea extracts in inhibiting *Streptococcus mutans* biofilm. Green and black tea leaves were extracted using 70% methanol. Determination of MIC was subsequently performed by microdilution method. Next, the biofilm formation and inhibition was run through microtiter plate method using flexible U-bottom PVC 96 wells, which then observed using microplate reader on $\lambda = 515$ nm. As the results, MIC for green and black tea extract stood at 4 mg/mL, 6 mg/mL, respectively. The biofilm inhibitory activity of black tea extract was at 8 and 10 mg/mL inhibiting 6% and 12.5% *S.mutans*. Green tea extract showed that concentration of 4 to 10 mg/mL was able to inhibit biofilm growth by 24%; 45%; 48% and 53%. Thus, through microtiter plate assay, it could be concluded that tea extract has potent antibiofilm to *S.mutans*, where green tea extract has better activity than black tea extract.

Corresponding Author:

Andi Arjuna

Fakultas Farmasi

Universitas Tadulako

Makassar, 90245

Indonesia

Mobile: 082345748488

Email: andiarjuna@unhas.ac.id

Copyright © 2017 JFG-UNTAD

This open access article is distributed under a Creative Commons Attribution (CC-BY-NC-SA) 4.0 International license.

How to cite (APA 6th Style):

Arjuna, A., et al. (2018). Uji Pendahuluan Anti-biofilm Ekstrak Teh Hijau dan Teh Hitam pada *Streptococcus mutans* melalui Metode Microtiter Plate. *Jurnal Farmasi Galenika : Galenika Journal of Pharmacy*, 4(1), 44-49. doi:10.22487/j24428744.2017.v3.i1.9965

ABSTRAK

Teh (*Camellia sinensis* L.) telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri yang sangat luas dipelajari terutama pada bakteri plankton, tanpa adanya penelitian yang dalam mengenai aktivitas biofilmnya. Sehingga, telah dilakukan penelitian mengenai uji pendahuluan aktivitas ekstrak teh hitam dan teh hijau dalam menghambat biofilm *Streptococcus mutans*. Daun teh hitam dan teh hijau masing-masing dimaserasi dengan metanol 70%. Nilai KHM dari sampel tersebut selanjutnya ditentukan melalui metode makrodilusi. Pembentukan dan penghambatan biofilm selanjutnya dilakukan melalui metode *microtiter plate* (menggunakan well 96 yang fleksibel dan *flat bottom*), dilanjutkan dengan pengamatan menggunakan microplate reader pada $\lambda = 515$ nm. Nilai KHM ekstrak teh hijau dan teh hitam diperoleh masing-masing pada konsentrasi 4 mg/ mL dan 6 mg/ mL. Hasilnya, ekstrak teh hitam dengan konsentrasi 8 dan 10 mg/ mL mampu menghambat biofilm *S.mutans* masing-masing sebesar 6% dan 12.5%. Sedangkan pada ekstrak teh hijau konsentrasi 4 sampai 10 mg/ mL menghambat biofilm *S.mutans* masing-masing 24%; 45%; 48%, dan 53%. Sehingga, melalui metode *microtiter plate* dapat disimpulkan bahwa semua ekstrak teh memiliki potensi besar sebagai antibiofilm *S.mutans*, dimana ekstrak hijau menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan ekstrak teh hitam.

Kata Kunci : biofilm, *microtiter plate*, *Streptococcusmutans*, teh hijau, teh hitam

PENDAHULUAN

Biofilm merupakan salah satu produk hasil interaksi dari *quorum sensing* (QS) dari masing-masing mikroorganisme. Proses pembentukan biofilm diawali ketika mikroba soliter melekat pada suatu permukaan yang cocok, selanjutnya akan menempel dan mengeluarkan signal QS. Pada saat terjadi komunikasi, bakteri akan mengeluarkan signal (*auto-inducers*) untuk memanggil bakteri-bakteri lainnya (Irie & Parsek, 2008). Mikroorganisme, baik bakteri gram positif -gram negatif maupun fungi mempunyai sistem QS yang berbeda-beda. Pada bakteri gram negatif menghasilkan signal AHL (*Acyl homoserine lactones*), bakteri gram positif menghasilkan signal peptida, sedangkan pada fungi menghasilkan senyawa farnesol ataupun tirosol sebagai sistem *quorum sensing* antar selnya (Kalia, 2013; Kim *et al*, 2015). Setelah mengeluarkan signal QS, bakteri akan mensekresikan EPS (*extracellular polymeric substance*) sebagai matriks pelindung yang kokoh. Setelah itu, bakteri membentuk mikrokoloni dan akan berkembang membentuk biofilm (Michael *et al*, 2003).

Bakteri *Streptococcus mutans* merupakan mikroorganisme kariogenik yang memicu terbentuknya plak biofilm pada gigi yang memetabolisme sukrosa menjadi gula yang lengket (Kawarai *et al*, 2016). Meningkatnya resistensi mikroba, seperti pada bakteri *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, dan *Eschericia coli* terhadap

antibiotika diketahui dapat dicegah dengan cara menghambat aktivitas QS antar mikroba, dengan asumsi jika biofilm berhasil dimanipulasi pembentukannya, penetrasi antibiotika akan lebih mudah terhadap mikroba target (Amaya *et al*, 2012; Chu *et al*, 2013; Jiménez-Gómez *et al*, 2007; Kim *et al*, 2015; Koh & Tham, 2011).

Studi penghambatan terbentuknya *biofilm* sekarang ini telah banyak dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan berbagai ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri. Salah satu tanaman yang dikenal memiliki aktivitas antibakteri yaitu tanaman teh (*Camellia sinensis* L.). Teh mengalami proses pengolahan tertentu dan dikategorikan menjadi tiga, yaitu tanpa fermentasi (teh hijau dan teh putih), semi-fermentasi (teh merah) dan melalui proses fermentasi (teh hitam) (Bancirova, 2010; McKay & Blumberg, 2002).

Penelitian-penelitian mengenai evaluasi aktivitas antibakteri dari tanaman teh (*Camellia sinensis* L.) telah banyak dilakukan terhadap bakteri *plankton*, namun belum banyak diketahui aktivitas penghambatan koloni biofilm pada bakteri. Oleh karena itu, dalam penelitian ini telah dilakukan studi aktivitas antibiofilm dari ekstrak daun teh (*Camellia sinensis* L.) hijau dan teh hitam terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, sebagai bentuk uji pendahuluan kemampuan ekstrak ini dalam manipulasi pembentukan biofilm *S.mutans*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah *microplate reader* (Biotek[®]), evaporator (Heidolph[®]), inkubator (Mettler[®]), lampu UV, seperangkat alat gelas (Pyrex[®]), *wells microplate 96 flat bottom*.

Bahan yang digunakan adalah teh hitam, teh hijau (diperoleh dari Malino Highland, Sulawesi Selatan), isolat bakteri *Streptococcus mutans* (Lab Mikrobiologi Farmasi UNHAS), *Brain heart infusion broth* (BHIB) (Merck[®]), *Nutrient broth* (NB) (Merck[®]), *Nutrient Agar* (NA) (Merck[®]), DMSO, metanol, etanol 96%, kristal violet (Merck[®]), *Mouthwash* (Listerine[®]).

Metode

Penyiapan sampel teh dan mikroba *S.mutans*

Penyiapan sampel –Sampel dipersiapkan sesuai dengan prosedur standar ekstraksi sampel dengan maserasi, dengan sedikit penyesuaian jenis sampel dan penyarinya. Sampel teh kering (teh hijau dan teh hitam) sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan direndam dalam cairan penyari metanol 70% sebanyak 50 mL (1:5), disimpan pada suhu ruang selama 3 hari sambil sesekali diaduk dan kemudian disaring. Ampas yang diperoleh kemudian diekstraksi kembali. Ekstrak metanol teh yang diperoleh kemudian digabung dan disaring menggunakan kertas Whatmann No.1 dan filtrat yang didapatkan kemudian dipekatkan menggunakan evaporator dengan suhu dibawah 45°C hingga didapatkan ekstrak kental (Kaur, Kaur, & Rana, 2015; Kawarai et al., 2016).

Penyiapan mikroba - Medium yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA) dan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) yang dipersiapkan sesuai dengan prosedur (12). Isolat bakteri uji *S.mutans* diinokulasikan ke media NA miring dan inkubasi pada 37°C selama 24 jam (O'Toole, 2011).

Penentuan Kadar Hambat Minimum

Penentuan nilai KHM dilakukan dengan metode *broth micro dilution*. Masing-masing ekstrak daun teh dibuat larutan stok 20% dalam DMSO 20%. Diambil masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 mg/mL, lalu dimasukkan dalam tabung reaksi dan dicukupkan hingga 1 mL dengan BHIB. Suspensi bakteri Mc Farland setara $1,5 \times 10^8$ CFU/mL dalam BHIB (1:150) sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya

diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi terendah yang menghasilkan efek penghambatan tercatat sebagai KHM (Kaur et al., 2015; Kawarai et al., 2016). Kontrol positif yaitu Listerine[®] dengan konsentrasi 45% v/v, media dan suspensi bakteri dan kontrol negatif.

Evaluasi pembentukan biofilm *S.mutans*

Untuk melihat pembentukan *biofilm* dari *Streptococcus mutans*, dimasukkan 75 µL BHIB + 2% sukrosa dan 25 µL suspensi bakteri ($1,5 \times 10^8$ CFU / mL) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, *microplates* kemudian dibilas menggunakan air steril dan sumuran pada *microplate* diwarnai dengan 0,1% kristal violet selama 15 menit, kemudian dibilas, apabila *microplates* tetap berwarna ungu, maka telah terbentuk biofilm pada sumuran *microplates* (O'Toole, 2011).

Evaluasi penghambatan biofilm *S.mutans*

Setelah variasi konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 mg/mL ekstrak dipersiapkan, masing-masing sampel dimasukkan ke dalam *microplates*, ditambahkan 100 µL suspensi bakteri *S.mutans* dalam BHIB dan dicukupkan dengan media BHIB hingga 200 µL. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dibuang dan dibilas dengan menggunakan air mengalir. Sumuran *microplate* kemudian ditambahkan larutan 0,1 % kristal violet. Setelah 15 menit, larutan kristal violet dibuang dan dibilas kembali menggunakan air. Selanjutnya *microplate* diisi dengan etanol 96% dan diinkubasi selama 15 menit. Media BHIB dan suspensi bakteri sebagai kontrol negatif dan Listerine[®] 45% v/v sebagai kontrol positif, kontrol pelarut yaitu DMSO 20 % v/v. Kontrol media yaitu hanya berisi media BHIB. Biomasa dari lapisan biofilm diukur dengan menggunakan alat *microplate reader* dengan panjang gelombang 515 nm (O'Toole, 2011).

Pengumpulan dan analisis data

Persentase penghambatan biofilm dihitung dengan menggunakan rumus berikut, (Pratiwi, Lagendijk, Hertiani, De Weert, & Van Den Hondel, 2015):

$$\% \text{ penghambatan} = (1 - (\frac{\chi_{ODt} - \chi_{ODmc}}{\chi_{ODvc}})) \times 100\%$$

Keterangan :

ODt = *Optical Density* (515 nm) sumuran yang diuji

ODmc = *Optical Density* kontrol media

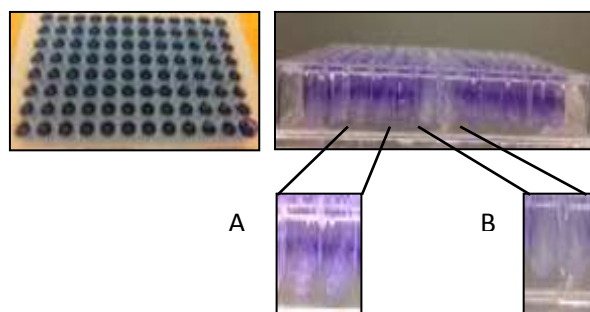
ODvc = *Optical Density* kontrol pelarut

Data yang diperoleh dari pengujian nilai KHM dan pengukuran kuantitatif dari penghambatan biofilm. Selanjutnya akan dilakukan pengumpulan dan analisis data berdasarkan hasil pengukuran yang telah dilakukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas antibakteri dari ekstrak teh hijau dan teh hitam sebelumnya ditentukan dengan metode mikrodilusi. Nilai konsentrasi hambat dari kedua ekstrak ini masing-masing 4 mg/mL untuk ekstrak teh hijau, dan 6 mg/mL untuk ekstrak teh hitam. Kedua konsentrasi ini lebih tinggi dari nilai konsentrasi hambat minimumnya yang dirujuk dari berbagai pustaka yaitu 0,104 mg/mL untuk teh hijau dan 0.088 mg/mL untuk teh hitam (Kaur *et al.*, 2015). Walaupun demikian, dengan mempertimbangkan sampel yang digunakan, maka konsentrasi hambat eksperimen dijadikan acuan dalam pengujian antibiofilm *S.mutans* dari berbagai konsentrasi kedua ekstrak.

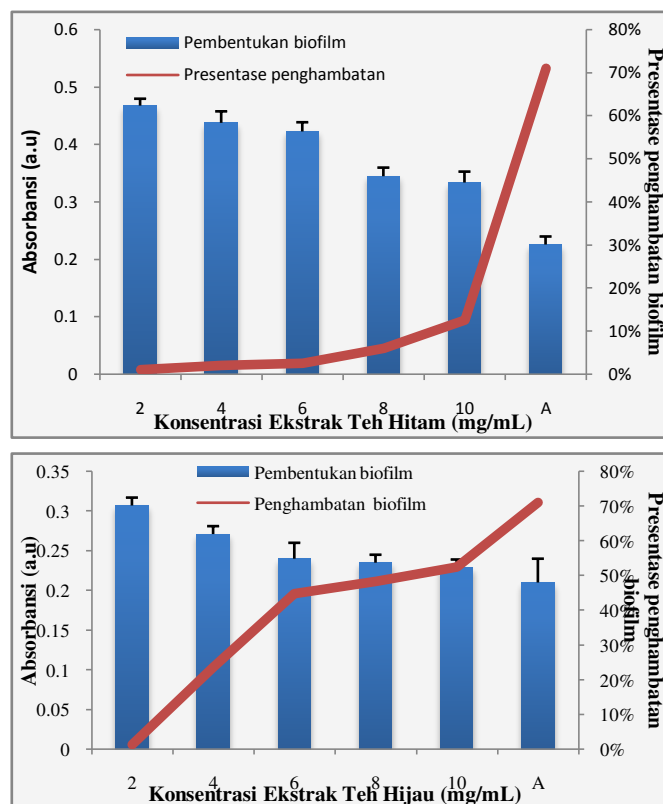
Pembentukan dan evaluasi penghambatan biofilm dilakukan dengan metode *microtiter plate*. Untuk mengevaluasi biofilm yang dibentuk oleh *S.mutans*, suspensi bakteri setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL McFarland dimasukkan kedalam masing-masing sumuran (*microtiter wells*), dicampurkan dengan medium. Setelah masa inkubasi 24 jam, sumuran dicuci dan diwarnai dengan Kristal Violet 0.1%, jika terbentuk warna ungu yang tidak tercuci maka banyaknya zat warna yang terikat diasumsikan sama dengan banyaknya biofilm mikroba pada sumuran (O'Toole, 2011) (gambar 1).



Gambar 1. Evaluasi pembentukan biofilm *S.mutans* pada *microplate* 96 wells U-shape bottom. Biofilm diklaim terbentuk (A), dan tidak terbentuk (B). A merupakan campuran *S.mutans* dan medium, sedangkan B merupakan medium tanpa *S.mutans*. Setelah inkubasi 24 jam, masing-masing sumuran dicuci dan diwarnai dengan kristal violet 0.1%.

Gambar 1 menunjukkan sumuran yang berwarna ungu (A) sebagai representatif terbentuknya biofilm mikroba, yaitu *S.mutans*. Jika diamati dari samping warna ungu terbentuk merata pada dinding. Hal ini disebabkan karena *S.mutans* merupakan bakteri *non-motile*. Berbeda dengan bakteri yang melakukan pergerakan banyak, biasanya warna ungu sumuran akan terpusat pada permukaan atas sumuran. Selain itu, sebagai bakteri anaerob fakultatif, biofilm yang terbentuk cenderung membentuk pola cincin pada permukaan sumuran yang mengindikasikan tetap adanya kecenderungan kebutuhan terhadap oksigen (Kim *et al.*, 2015; O'Toole, 2011).

Terbentuk dan stabilnya zat warna kristal violet pada biofilm *S.mutans* yang menempel pada sumuran, pada dasarnya mengikuti mekanisme pengecatan gram pada umumnya. Sebagai bakteri gram positif *S.mutans* 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 dengan dapar posfat (Kawarai *et al.*, 2016).



Gambar 2. Efek ekstrak teh hitam (atas) dan ekstrak teh hijau (bawah) pada pembentukan dan penghambatan biofilm *S.mutans*. Kuantitas yang digambarkan sebagai rata-rata $\pm$ SD dari tiga kali pengujian.

Stabilnya warna ungu pada sumuran kemudian dimanfaatkan untuk mengevaluasi kemampuan ekstrak teh hijau dan teh hitam memanipulasi biofilm *S.mutans* yang terbentuk. Pada gambar 2, walaupun presentase penghambatan kontrol positif (*mouthwash*) mencapai 71%, kedua sampel ekstrak juga tetap menunjukkan kemampuan penghambatan terbentuknya biofilm yang signifikan.

Ekstrak teh hijau memberikan hasil yang lebih signifikan dibandingkan dengan ekstrak teh hitam. Misalnya pada konsentrasi 6 mg/mL saja, ekstrak teh hijau telah memiliki aktivitas penghambatan sebesar 45% dimana penghambatan oleh ekstrak teh hitam masih pada 1%. Rata-rata pembentukan biofilm yang terbentuk pada umumnya juga ditekan oleh ekstrak teh hijau. Pada konsentrasi terkecil pun, absorbansi pembentukan biofilm *S.mutans* hanya mencapai $0.307 \text{ a.u} < 0.468 \text{ a.u}$ oleh ekstrak teh hitam. Penghambatan biofilm dari ekstrak teh hitam mulai efektif pada konsentrasi 8 mg/mL, sebesar 6% dan pada konsentrasi 10 mg/mL yaitu sebesar 12,5%, sedangkan penghambatan ekstrak teh hijau pada kondisi yang sama adalah masing-masing 48% dan 53%.

Perbedaan hasil presentase penghambatan antara kedua teh yang digunakan diduga kuat oleh karena perbedaan konsentrasi kandungan fenoliknya. Ekstrak teh hijau selalu memiliki kandungan fenolik lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak teh hitam (Bancirova, 2010; Kawarai et al., 2016). Hal ini dipengaruhi karena pada proses pembuatan teh hitam, setelah daun teh digulung, kandungan senyawa fenolik pada daun teh ini diketahui akan mengalami oksidasi oleh *polyphenol oxidase* selama 90-120 menit. Berbeda dengan pengolahan teh hijau, setelah dipetik, daun teh ini biasanya akan dikukus untuk meminimalisir oksidasi sehingga dapat menginaktivasi *polyphenol oxidase* sebelum proses pengeringan dilanjutkan (McKay & Blumberg, 2002).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak teh hijau dengan kandungan fenolik yang lebih tinggi berpotensi menghambat pembentukan biofilm *S.mutans* dibandingkan dengan ekstrak teh hitam. Ekstrak teh hijau menunjukkan aktivitas penghambatan biofilm dari konsentrasi $\geq 2 \text{ mg/mL}$. Sedangkan pada ekstrak teh hitam penghambatan hanya akan dicapai pada konsentrasi ekstrak $\geq 8 \text{ mg/mL}$.

KESIMPULAN

Ekstrak teh hijau dan teh hitam memiliki potensi sebagai anti-biofilm *S.mutans* yang dievaluasi dengan metode *microtiter plate*. Pada konsentrasi 10 mg/mL, ekstrak teh hijau memiliki potensi lebih tinggi (53%) dibandingkan dengan ekstrak teh hitam (13%) menghambat biofilm *S.mutans*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Farmakognosi-Fitokimia, dan Biofarmaka UNHAS sebagai sarana penunjang penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaya, S., Pereira, J. A., Borkosky, S. A., Valdez, J. C., Bardón, A., & Arena, M. E. (2012). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by sesquiterpene lactones. *Phytomedicine*, 19(13), 1173-1177.
- Bancirova, M. (2010). Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. *Food Research International*, 43(5), 1379-1382.
- Chu, W., Zhou, S., Jiang, Y., Zhu, W., Zhuang, X., & Fu, J. (2013). Effect of traditional Chinese herbal medicine with antiquorum sensing activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Irie, Y., & Parsek, M. R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms *Bacterial biofilms* (pp. 67-84): Springer.
- Jiménez-Gómez, P., Pozuelo de Felipe, M., Llinares Pinell, F., & Garcia de los Rios, J. (2007). Quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella*: Active natural compounds as antagonists. *Commun Curr Res Edu Topics Trends App Microbiol*, 1, 41-51.
- Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology advances*, 31(2), 224-245.
- Kaur, H., Kaur, S., & Rana, S. (2015). Antibacterial Activity and Phytochemical Profile of Green Tea, Black Tea and Divya Peya Herbal Tea. *Int J Pure App Biosci*, 3(3), 117-123.
- Kawarai, T., Narisawa, N., Yoneda, S., Tsutsumi, Y., Ishikawa, J., Hoshino, Y., & Senpuku, H. (2016). Inhibition of *Streptococcus mutans*

biofilm formation using extracts from Assam tea compared to green tea. *Archives of oral biology*, 68, 73-82.

- Kim, H.-S., Lee, S.-H., Byun, Y., & Park, H.-D. (2015). 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Scientific reports*, 5.
- Koh, K. H., & Tham, F.-Y. (2011). Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44(2), 144-148.
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2002). The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(1), 1-13.
- Michael, T. M., John, M., & Jack, P. (2003). Biology of microorganisms. *Pearson Education, Inc. Upper Saddle River, New Jersey*, 66-67.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*(47).
- Pratiwi, S. U., Lagendijk, E. L., Hertiani, T., De Weert, S., & Van Den Hondel, C. A. (2015). Antimicrobial effects of Indonesian medicinal plants extracts on planktonic and biofilm growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Horticulture*, 2015.