

# Optimisasi uji berbasis reduksi resazurin dalam menghambat aktivitas *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756

## Optimization of the microplate resazurin assay for screening against *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756

MARTHA SARI<sup>♥</sup>, EKA ARISMA YANTI, WIEN KUSHARYOTO

Laboratorium Rekayasa Genetika Terapan dan Desain Protein, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Raya Bogor Km 46 Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-8754587, Fax.: +62-21-8754588, ♥email: martha.biotek@gmail.com

Manuskrip diterima: 6 September 2016. Revisi disetujui: 14 Desember 2016.

**Abstrak.** Sari M, Arismayanti E, Kusharyoto W. 2016. Optimisasi uji berbasis reduksi resazurin dalam menghambat aktivitas *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2*: 189-192. Metode uji reduksi resazurin (MRRA) merupakan metode cepat untuk mengevaluasi produk ekstrak alami dan obat sintesis yang berperan dalam menekan pertumbuhan mikobakterium dengan pewarna resazurin sebagai indikator. Penelitian ini bertujuan untuk menyajikan optimisasi pengujian awal dari kondisi yang mempengaruhi aktivitas pertumbuhan mikobakterium. Deteksi MRRA dari ekstrak tanaman obat menggunakan mikroba *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756 berlangsung selama 1-2 hari inkubasi dalam cawan mikro pada suhu 37°C. Variasi kondisi uji dievaluasi seperti konsentrasi indikator resazurin, konsentrasi pelarut DMSO, dan durasi waktu inkubasi sebagai aktivitas anti-mikobakterium. Hasil pengujian awal menunjukkan bahwa optimisasi uji MRRA menggunakan pelarut 0,5% DMSO, pewarna 60 µg/mL resazurin, dan penambahan 5% tween 80 merupakan kondisi ideal bagi penurunan aktivitas mikobakterium selama 24 jam waktu inkubasi. Deteksi ekstrak menggunakan metode MRRA menunjukkan suatu model uji yang cepat, sederhana, dan sensitivitas tinggi untuk pengembangan potensi ekstrak herbal dari tanaman obat Indonesia.

**Kata kunci:** Anti-mikobakterium, mikropelat reduksi resazurin, *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756, optimisasi

**Abstract.** Sari M, Arismayanti E, Kusharyoto W. 2016. Optimization of the microplate resazurin assay for screening against *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 2*: 189-192. Microplate resazurin reduction assay (MRRA) is a rapid method to evaluate the natural extract products and the synthetic drug used to suppress anti-*Mycobacterium* growth using a resazurin dye as an indicator. This study aimed to present a pre-screening optimization of condition that affects mycobacterium growth activity. The detection of MRRA from medicine plant extract using *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756 was conducted for 1-2 days incubation in a microplate with 37°C. Variation assay conditions were evaluated such as resazurin indicator concentration, DMSO solvent concentration and incubation time duration as an anti-mycobacterial activity. The result of pre-screen showed that the optimization of MRRA using 0.5% DMSO solvent and a resazurin dye of 60 µg/mL with an addition of 5% tween 80 for 24 hours incubation was an ideal condition for decreasing mycobacterium activity. The detection of extract using MRRA assay showed a screen model has rapid detection, simple, and good sensitivity for the development of potential natural extracts from Indonesian medicinal plants.

**Keywords:** Anti-mycobacterium, microplate resazurin reduction assay, MRRA, *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756, optimization

### PENDAHULUAN

Tuberculosis (TB) merupakan salah satu penyakit yang menjadi fokus dunia saat ini. Indonesia termasuk ke dalam 8 negara penderita TB terbanyak di dunia. Penyakit TB disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, merupakan penyakit yang paling cepat penyebarannya serta memiliki tingkat resistensi tinggi terhadap obat terapi atau antibiotik. Kebutuhan untuk menemukan senyawa baru sebagai obat anti-mikobakterium sangat mendesak untuk dilakukan, mengingat pengobatan TB saat ini tergolong kompleks, mahal, dan membutuhkan jangka waktu yang lebih lama. WHO (2012) telah mendeklarasikan bahwa TB berada dalam status kondisi darurat di dunia. Tren peningkatan

resistensi obat terapi terhadap mikobakterium dan lamanya waktu pengobatan penderita TB sangat mengkhawatirkan, sekaligus menekankan pentingnya penemuan senyawa-senyawa obat baru terhadap TB yang saat ini masih minim tersedia (Voelker et al. 2013).

Metode mikropelat reduksi resazurin (MRRA) merupakan metode uji menggunakan resazurin sebagai indikator warna dalam mendeteksi aktivitas sel mikobakterium. Bentuk teroksidasi resazurin berwarna biru (tidak berfluoresensi) dan ketika direduksi oleh sel-sel bakteri hidup berubah bentuk menjadi resofurin yang berwarna merah muda dan berfluoresensi. Selanjutnya, nilai fluoresensi yang dihasilkan dapat dikuantifikasi dan diketahui besaran kualitas penghambatan ekstrak.

Pencarian terhadap senyawa aktif sebagai anti-mikobakterium sering terhambat oleh keterbatasan pengujian (*assay*), khususnya dalam pengujian berbasis unit pembentukan koloni. MRRA merupakan metode yang efektif untuk menguji keaktifan produk-produk alam seperti ekstrak dari sumber tanaman maupun mikroba (Martin et al. 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk menyajikan kondisi optimal terhadap pengujian berbasis reduksi resazurin menggunakan ekstrak tanaman obat untuk menekan aktivitas *Mycobacterium bovis* strain BCG 43756.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan material ekstrak tanaman

Tanaman obat yang digunakan dalam pengujian ini bersumber dari simplisia *P. granatum* (diperoleh secara komersial di lokasi sekitar Jawa Tengah). Bagian tanaman yang diekstraksi yaitu kulit buah dan biji kering. Simplisia yang telah kering dicacah secara random sebanyak 30 gram dan di-soxhlet dengan 300 mL pelarut metanol (1:1) pada suhu 40-50°C. Hasil ekstrak *P. granatum* dalam pelarut metanol selanjutnya dikeringkan menjadi konsentrat dengan teknik evaporasi dan disimpan dalam ruang bersuhu -20°C (O'Neill et al. 2013).

### Galur mikobakterium yang digunakan

Mikroba *Mycobacterium bovis* strain 43756 galur BCG digunakan sebagai mikobakteri model dalam uji MRRA. Kultur *M. bovis* ditumbuhkan pada fase logaritmik dalam medium Middlebrook 7H9. Proses pengujian menggunakan fasilitas keamanan hayati tingkat 2 (BSL-2). Kultur diinkubasi dalam pengocok bersuhu ruang selama 24 jam inkubasi (O'Neill et al. 2013).

### Metode uji MRRA

Pengujian dilakukan dalam cawan mikro berisi 96 sumur (96 well microtiter plate) steril. Mikroba uji *M. bovis* dikulturkan dalam kondisi kelembapan relatif 90% pada suhu 37°C selama 24 jam dalam medium Middlebrook 7H9. Kultur sel *M. bovis* dikondisikan segar hingga tingkat kekeruhan mencapai OD600 = 0,005, setara dengan  $2,5 \times 10^5$  cfu/mL. Antibiotik Rifampisin digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan pelarut DMSO sebagai kontrol negatif dimana ekstrak tanaman berada dalam pelarut DMSO serta media tumbuh Middlebrook 7H9 disertakan pada tiap sumur dalam cawan mikro. Sebanyak 150 µL suspensi *M. bovis* diaplikasikan ke dalam campuran larutan uji dan dilakukan secara triplo. Cawan mikrotiter berisi suspensi mikroba pada tiap perlakuan, selanjutnya diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu ruang. Setelah diinkubasi, 30 µL larutan pendeteksi resazurin dalam 5% tween 80 dimasukkan ke dalam tiap-tiap sumur dan diinkubasi lebih lanjut selama 2 jam. Cawan ditutup dengan *microplate sealing film sterile* sebelum pengukuran suspensi dengan alat spektrofotometer (panjang gelombang eksitasi 530 nm dan emisi 590 nm) pada suhu 37°C (Taneja et al. 2007). Persentase penghambatan

terhadap pertumbuhan mikobakteri pada tiap sumur dan kontrol positif dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

Persentase penghambatan (%) =  $100\% - (1 - \text{fluoresensi sampel uji} / \text{fluoresensi kontrol negatif})$

### Determinasi waktu reduksi resazurin

Optimasi durasi waktu inkubasi MRRA ditentukan dengan mengukur nilai intensitas warna (fluoresensi) dari pertumbuhan bakteri setelah 24 jam diinkubasi. Perlakuan ekstrak tanaman (2 µg/mL di dalam larutan DMSO 1%, 2%, dan 3%, v/v), larutan Rifampisin (0,2 µg/mL dalam 2% DMSO) sebagai kontrol positif, dan larutan DMSO 1%, 2%, dan 3% sebagai kontrol negatif, dilakukan secara triplo. Blanko disertakan dalam setiap perlakuan. Larutan indikator resazurin (60 µg/mL dalam 5% tween 80) ditambahkan setelah 1-3 hari selama inkubasi perlakuan. Nilai pengukuran fluoresensi dilakukan 2 jam setelah pemberian pendeteksi resazurin dalam suspensi bakteri dan ekstrak (O'Neill 2014).

### Determinasi konsentrasi indikator resazurin

Optimasi konsentrasi indikator resazurin dilakukan dengan menguji variasi konsentrasi resazurin yang diaplikasikan sebanyak 15, 30, 45, 60, dan 120 µg/mL dalam 5% pelarut dan tanpa pelarut tween 80 (akuades). Perlakuan uji menggunakan kontrol positif berupa Rifampisin (0,2 µg/mL) dan kontrol negatif berupa larutan 2% DMSO tanpa disertai pengujian dengan ekstrak tanaman. Seluruh perlakuan dikerjakan secara triplo. Pemberian variasi indikator resazurin dalam 5% tween 80 dan tanpa tween 80, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pengukuran intensitas fluoresensi diukur setelah reaksi berlangsung selama 2 jam dalam pewarna resazurin dan diukur menggunakan spektrofotometer pada suhu -20°C (O'Neill 2014).

### Determinasi konsentrasi pelarut

Optimasi konsentrasi DMSO yang digunakan dalam MRRA ditentukan dengan membuat seri konsentrasi DMSO (0,5; 1; 2; 3; 4; dan 5%) dan Rifampisin (0,2 µg/mL) kemudian diuji secara triplo. Setelah 24 jam masa inkubasi, ke dalam cawan mikro dimasukkan 50 µL indikator resazurin (60 µg/mL dalam 5% tween 80). Pengukuran intensitas warna dilakukan setelah reaksi berlangsung selama 2 jam dan diukur dengan spektrofotometer pada suhu -20°C (O'Neill 2014).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Determinasi waktu reduksi resazurin

Penentuan kondisi optimisasi pada pengujian MRRA dimaksudkan untuk mengetahui kondisi ideal dalam menyediakan keseimbangan uji yang cepat, stabil, dan tingkat akurasi yang baik. Keberagaman tingkatan uji MRRA selama inkubasi dengan resazurin sering kali berbeda-beda dan berlangsung sekian lama menurut eksperimen sebelumnya. Pembentukan kompleks

kestabilan warna resazurin dalam MRRA tercapai setelah 48 jam waktu inkubasi oleh Taneja et al. (2007), sedangkan menurut Lemus et al. (2004) dan Martin et al. (2003), pengukuran warna terbentuk hanya setelah 24 jam inkubasi berlangsung tanpa melihat tingkat kestabilan warna. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan standar protokol yang optimal dalam pengujian MRRA menurut data yang diperoleh sebelumnya.

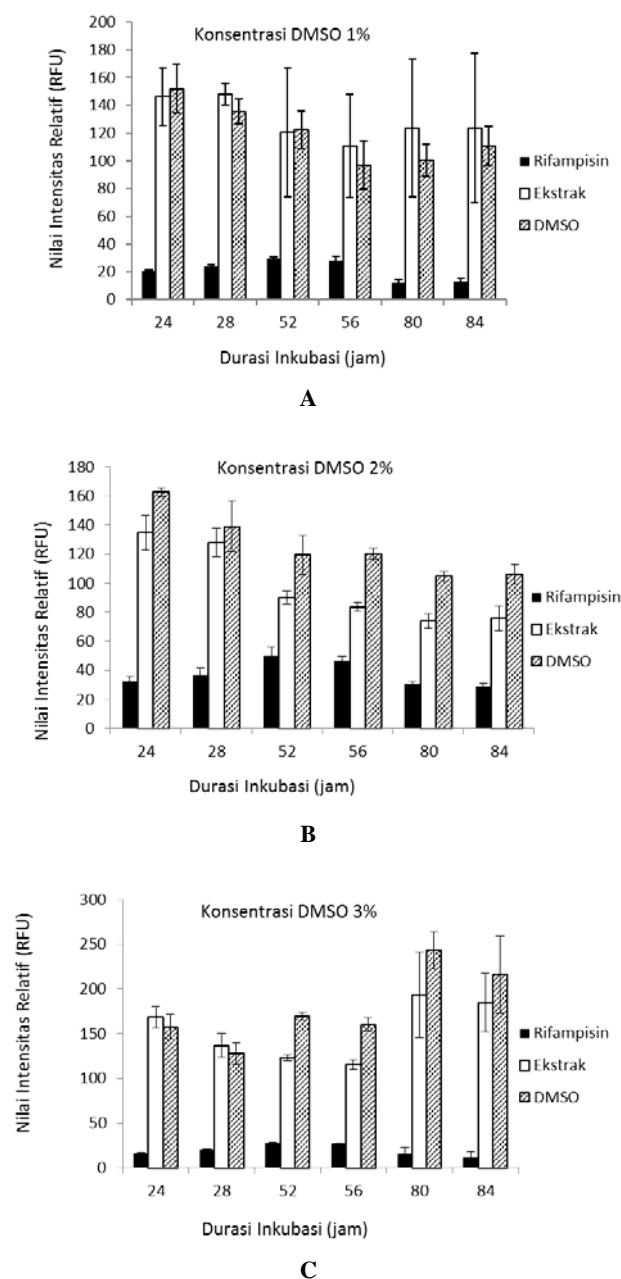
Berdasarkan Gambar 1A, B, dan C, terlihat bahwa peningkatan masa inkubasi yang semakin lama pada ketiga perlakuan (variasi konsentrasi ekstrak, Rifampisin, dan larutan DMSO) belum tentu berkorelasi positif terhadap tingkat intensitas warna (fluoresensi) yang terbentuk. Perbedaan mencolok terlihat pada perlakuan Rifampisin, dimana nilai fluoresensi lebih rendah dibandingkan ekstrak tanaman dan juga pelarut DMSO selama durasi waktu inkubasi. Munculnya nilai fluoresensi yang relatif cukup tinggi ditunjukkan dalam pelarut DMSO. Pelarut DMSO sebagai kontrol negatif menangkap efek warna yang terukur pada alat spektrofotometer. Efek warna yang muncul adalah merah muda yang merupakan warna negatif bagi pertumbuhan mikobakterium. Sebaliknya, warna biru yang muncul pada ekstrak aktif tanaman merupakan warna yang setara dengan Rifampisin sebagai kontrol positif (O'Neill 2014).

Intensitas warna relatif tinggi dan stabil (lebih besar atau mendekati 140 U, ditunjukkan pada semua perlakuan pelarut 1%, 2%, dan 3% DMSO) pada durasi inkubasi 24 jam. Selanjutnya, waktu inkubasi optimal yang didukung oleh hasil uji aktivitas anti-mikobakterium dalam metode MRRA menggunakan mikroba uji *M. bovis strain* BCG 43756 adalah 24 jam. Masa inkubasi optimal tersebut digunakan untuk mengetahui tingkat keaktifan ekstrak tanaman termasuk jenis ekstrak yang lemah, moderat, atau cukup tinggi.

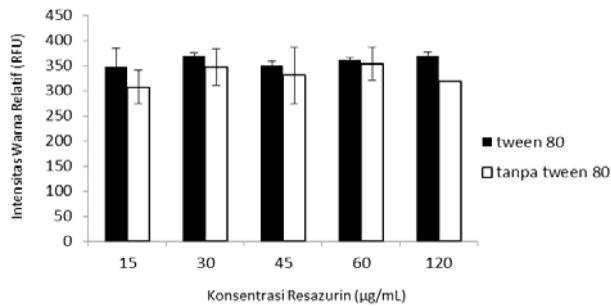
### Determinasi konsentrasi indikator resazurin

Hasil yang tidak berbeda jauh diperoleh antara pengaruh konsentrasi pelarut resazurin dan intensitas reduksi mikobakterium dalam durasi 24 jam inkubasi. Pelarut tween 80 sebagai surfaktan dalam *bioassay* MRRA dapat mereduksi kemampuan sel mikobakterium untuk saling merekat/menempel satu sama lain. Pelarut tween selanjutnya dapat meningkatkan area kontak antarpermukaan, penyerapan, dan proses metabolisme resazurin dalam sel sehingga memfasilitasi pereduksi membentuk resofurin. Hasil pada Gambar 2 menunjukkan bahwa pelarut tween 80 memberikan pengaruh nyata terhadap pengujian sel dalam cawan mikrotiter. Konsentrasi resazurin 30  $\mu\text{g/mL}$  dan 60  $\mu\text{g/mL}$  dalam tween 80 memberikan pengaruh terhadap intensitas reduksi sel yang cukup setara, sedangkan pada konsentrasi 120  $\mu\text{g/mL}$  juga memberikan hasil yang tidak berbeda jauh. Proses pembentukan warna dan reduksi sel yang paling cepat terbentuk dan stabil terjadi pada konsentrasi resazurin 60  $\mu\text{g/mL}$ . Selanjutnya, larutan indikator 60  $\mu\text{g/mL}$  resazurin dalam 5% cairan tween 80 digunakan dalam uji anti-mikobakterium dengan metode MRRA. Metode uji yang sama telah digunakan untuk mengevaluasi aktivitas anti-mikobakterium dalam ekstrak tanaman oleh Webster et

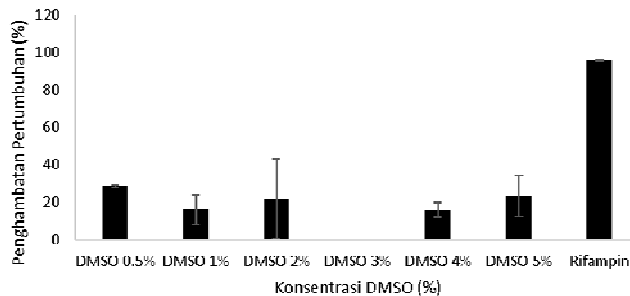
al. (2010), Carpenter et al. (2012), dan Yajco et al. (1995) dengan hasil berbeda ditunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,125 mg/mL dan 0,02 mg/mL, serta perbandingan konsentrasi resazurin dan tween 80 (1:1) merupakan perbandingan efektif untuk pembentukan kestabilan warna hasil reduksi oleh mikobakterium.



**Gambar 1.** Perbandingan pengaruh waktu inkubasi terhadap nilai intensitas warna relatif yang diperoleh dari perlakuan *M. bovis* menggunakan pelarut Rifampisin (0,2  $\mu\text{g/mL}$ ) dan ekstrak *P. granatum* (2  $\mu\text{g/mL}$ ) dalam pelarut DMSO: (A) 1%, (B) 2%, dan (C) 3%.



**Gambar 2.** Perbandingan pengaruh variasi konsentrasi resazurin terhadap nilai intensitas warna relatif pada pertumbuhan *M. bovis* setelah 24 jam waktu inkubasi dalam pelarut 5% tween 80 dan tanpa tween 80 (akuades).



**Gambar 3.** Pengaruh variasi konsentrasi DMSO terhadap penghambatan pertumbuhan *M. bovis* selama 24 jam waktu inkubasi.

### Determinasi konsentrasi pelarut

Pengujian aktivitas anti-mikobakterium terhadap variasi pelarut DMSO dari interval konsentrasi 0,5% sampai dengan 5% bertujuan untuk menghindari bias nilai penghambatan yang dapat muncul akibat pengaruh pelarut. Hasil pada Gambar 3 menunjukkan bahwa keseluruhan konsentrasi pelarut tidak memiliki pengaruh penghambatan aktivitas anti-mikobakterium. Meskipun variasi konsentrasi DMSO tidak memiliki perbedaan yang signifikan terhadap nilai penghambatan sel *M. bovis*, tingkat kelarutan ekstrak diduga dapat berpengaruh apabila digunakan pelarut dengan konsentrasi tinggi (sangat kental). Hasil yang diperoleh mengungkapkan bahwa konsentrasi pelarut DMSO tertinggi (5%) menghasilkan 19% penghambatan, sedangkan konsentrasi DMSO 0,5% menghasilkan 23% penghambatan yang merupakan kondisi optimal jika dikaitkan dengan tingkat kelarutan sampel dan ketersediaan pertumbuhan sel *M. bovis*. Kondisi berbeda diberikan oleh Renu et al. (2010) dan Sivakumar et al. (2011) yang menyatakan bahwa aktivitas anti-mikobakterium berhasil diaplikasikan menggunakan mikroba *M. tuberculosis*

dengan metode MRRA tanpa pelarut DMSO, namun menggunakan pelarut akuades.

Pengujian aktivitas anti-mikobakterium menggunakan metode MRRA merupakan pengujian yang cepat, sederhana, dan memiliki sensitivitas tinggi dalam pengujian ekstrak tanaman maupun ekstrak obat komersial menggunakan indikator resazurin. Optimisasi kondisi MRRA menggunakan mikroba *M. bovis* strain BCG 43756 diperoleh pada pelarut 0,5% DMSO dengan konsentrasi resazurin 60 dalam 5% tween 80 selama 24 jam waktu inkubasi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini difasilitasi oleh Proyek Unggulan LIPI 2015, Puslit Bioteknologi - LIPI dan sumber mikroba uji diperoleh dari kultur koleksi lembaga riset DSMZ Jerman. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang membantu dalam penelitian ini dan sumber-sumber ilmiah dalam penulisan literatur kami.

### DAFTAR PUSTAKA

- Carpenter CD, O'Neill T, Picot N et al. 2012. Anti-mycobacterial natural products from the Canadian medicinal plants *Juniperus communis*. *J Ethnopharmacol* 143 (2): 695-700.
- Lemus D, Martin A, Montoro E et al. 2004. Rapid alternative methods for detection of Rifampisin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemoter* 54: 130-133.
- Martin S, Camachi M, Portaels F et al. 2003. Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. *Antimicrob Agents Chemoter* 47 (11): 3616-3619.
- O'Neill T, Johnson JA, Webster D et al. 2013. The Canadian medicinal plant *Heracleum maximum* contains antimycobacterial diynes and furanocoumarins. *J Ethnopharmacol* 147 (2013): 232-237.
- O'Neill T, Li H, Colquhoun CD et al. 2014. Optimization of the microplate resazurin assay for screening and bioassay-guided fractionation of phytochemical extracts against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytochem Anal* 25: 461-467.
- Renu G, Thakur B, Singh P et al. 2010. Anti-tuberculosis activity of selected medicinal plants against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res* 131: 809-813.
- Sivakumar A, Jayaraman G. 2011. Anti-tuberculosis activity of commonly used medicinal plants of south India. *J Med Plants Res* 5 (31): 6881-6884.
- Taneja NK, Tyagi JS. 2007. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J Antimicrob Chemoter* 10: 1-6.
- Voelker R. 2013. MDR-TB has new drug foe after fast-track approval. *J Amer Med Assoc* 309 (5): 430-430.
- Webster D, Timothy DGL, Moore J et al. 2010. Anti-mycobacterial screening of traditional medicinal plants using the microplate resazurin assay. *Can J Microbiol* 56: 478-494.
- WHO [World Health Organization]. 2012. Global tuberculosis report 2012. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Geneva, Switzerland.
- Yajko DM, Madej JJ, Lakanster MV et al. 1995. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agent for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 33 (9): 2324-2327.