

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian menggunakan kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) karena banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia sebagai bahan obat tradisional dan kemudahannya dalam memperoleh di berbagai tempat terutama Pulau Jawa. Bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) diketahui memiliki berbagai kandungan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan biofilm bakteri seperti flavonoid, fenol, tannin, saponin, alkaloid, dan proantosianidin. Enzim glikosida hidrolase yang terdapat pada bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dapat mendegradasi ikatan glikosidik dalam rantai polisakarida biofilm dengan cara memecah ikatan glikosidik menjadi subunit yang lebih kecil atau monomer, sehingga dapat menghambat pembentukan biofilm (Fleming *et al*, dalam Jaddoa & Gharb, 2021). Proantosianidin dalam bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) juga dapat menghambat pembentukan biofilm dengan cara mencegah adesi antar sel dalam biofilm sehingga perlekatan sel dapat berkurang (Liebert dalam Jaddoa & Gharb, 2021).

Penelitian dimulai dengan mengekstraksi simplisia kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dengan menggunakan pelarut etanol 50%. Berdasarkan penelitian Duy *et al.* (2019), etanol 50% merupakan pelarut paling efisien untuk ekstraksi bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*). Pelarut etanol 50% dengan bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder fenol sebesar 762,11 mg RE/L dan senyawa flavonoid sebesar 508,64 RE/L yang

merupakan hasil senyawa metabolit terbesar daripada pelarut etanol 70% dan 90%. Penelitian Yagi dan Hussain pada tahun 2020 juga menyatakan bahwa pelarut etanol, utamanya etanol 50%, merupakan pelarut yang paling banyak menghasilkan senyawa polifenol pada ekstraksi bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*).

Bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan dari sampel swab luka pasien Diabetes. Sampel diidentifikasi dengan pengecatan gram, penanaman pada media BAP dan MSA, uji katalase, uji koagulase, dan isolasi pada media NAS. Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri gram positif dengan bentuk kokus bergerombol. Bakteri gram positif akan berwarna ungu ketika diamati dengan mikroskop. Warna tersebut dikarenakan dinding sel bakteri gram positif yang tersusun dari peptidoglikan yang tebal sehingga mampu mempertahankan pewarna pertama yaitu kristal violet meskipun telah diberi zat peluntur yaitu alkohol (Hamidah *et al.*, 2019). Sampel yang menunjukkan adanya bakteri kokus gram positif kemudian dilanjutkan dengan penanaman pada media BAP dan MSA. Pada media BAP, bakteri *Staphylococcus aureus* akan menunjukkan koloni dengan hemolisa β . Media BAP digunakan untuk membedakan bakteri patogenik berdasarkan kemampuannya dalam menghemolisa darah pada media (Turista dan Puspitasari, 2019). Pada media MSA (Manitol Salt Agar) koloni bakteri akan berwarna kuning yang disertai dengan perubahan media dari warna merah menjadi kuning akibat dari fermentasi mannitol oleh *Staphylococcus aureus*. Media MSA mengandung garam natrium klorida sebesar 7,5% sehingga menjadi media selektif karena sebagian besar bakteri tidak dapat tumbuh pada konsentrasi garam 7,5% kecuali bakteri *Staphylococcus* (Hayati *et al.*, 2019).

Koloni bakteri pada media MSA kemudian dilakukan uji katalase dan uji koagulase untuk mengkonfirmasi bakteri yang tumbuh merupakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Arif (2017) menyatakan bahwa *Staphylococcus* memproduksi enzim katalase yang mampu menghidrolisis hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2) yang berbentuk gelembung gas. Uji katalase yang menghasilkan hasil positif kemudian dilanjutkan dengan uji koagulase. Uji koagulase digunakan untuk melihat adanya enzim koagulase yang merupakan protein ekstraseluler *Staphylococcus aureus* yang dapat menggumpalkan plasma. Penggumpalan plasma terjadi karena terdapat protein yang menyerupai enzim ketika ditambahkan oksalat atau sitrat sehingga dapat mengakibatkan penggumpalan. Kemampuan penggumpalan plasma tersebut menjadi salah satu faktor virulensi dalam proses patogenesis *Staphylococcus aureus* (Hayati *et al.*, 2019). Sampel yang memberikan hasil positif pada kedua uji tersebut kemudian diisolasi pada media NAS untuk mendapatkan isolat murni dari bakteri.

Staphylococcus aureus ditumbuhkan menjadi biofilm dengan menggunakan metode *microtiter plate*. Media pertumbuhan yang digunakan untuk metode *microtiter plate* umumnya ialah media TSB yang mampu merangsang pembentukan biofilm (Lesmana *et al.*, 2019). Beberapa penelitian menggunakan media TSB yang ditambahkan glukosa untuk lebih merangsang pertumbuhan biofilm. Penambahan glukosa pada media TSB diketahui dapat meningkatkan regulasi dari ekspresi gen *locus icaABCD*. Ekspresi gen tersebut ialah sintesis dari PIA atau *polysaccharide intracellular adhesion* yang merupakan salah satu bahan dalam biofilm yang memiliki peran penempelan antar sel bakteri yang terjadi pada fase maturasi biofilm. *Polysaccharide intracellular adhesion* akan meningkat sejalan dengan

proses penempelan antar sel bakteri, mengakibatkan pembentukan biofilm semakin tebal (Masrukhin *et al.*, 2021). Pembentukan biofilm dengan media TSB yang ditambahkan glukosa diketahui menghasilkan biofilm yang lebih konsisten dalam metode *microtiter plate*. Media TSB yang dilengkapi glukosa 1% adalah media kultur yang paling tepat untuk digunakan sebagai media pembentukan biofilm karena menghasilkan biofilm yang lebih tebal sehingga baik untuk digunakan sebagai media pengukuran biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* (Lade *et al.*, 2019).

Metode *microtiter plate* merupakan metode *gold standard* yang digunakan untuk melihat penumpukan biomassa biofilm dengan cara mewarnai biomassa menggunakan cat kristal violet. Biofilm yang telah ditumbuhkan dalam *microtiter plate-96 wells* kemudian diwarnai dengan menggunakan kristal violet dan diukur menggunakan spektrofotometer atau ELISA *reader*. Kristal violet merupakan salah satu dari metode yang digunakan untuk pengujian biofilm yang menggunakan parameter biomassa dari biofilm. Pengecatan dengan kristal violet akan mewarnai sel yang hidup dan sel yang telah mati serta bahan-bahan yang menjadi penyusun matriks biofilm sehingga sesuai untuk mengukur total biomassa dari biofilm (Azeredo, 2017). Kristal violet merupakan pewarna protein yang digunakan secara umum yang diketahui mampu berikatan dan mewarnai permukaan molekul yang memiliki muatan negatif seperti matriks eksopolisakarida yang merupakan bahan penyusun dari matriks biofilm (Petrachi, 2017). Lee *et al.*, (dikutip dari Sternberg, Bjarnsholt, & Shitliff, dalam Donelli, 2014) menyatakan bahwa metode ini dapat digunakan untuk menguji mutan yang terbentuk pada biofilm dan untuk skrining antibiotik yang dapat membunuh dan menghambat penyebaran biofilm (Sternberg,

Bjarnsholt, & Shitliff, dalam Donelli, 2014). Biofilm pada *microtiter plate* yang telah diwarnai dibaca dengan spektrofotometer atau dapat dengan ELISA *reader* yang berbasis spektrofotometri.

Spektrofotometer memiliki prinsip kerja dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu sesuai jenis atom pada obyek kaca. Sebagian dari cahaya tersebut akan diserap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang dilewatkan tersebut sebanding dengan konsentrasi larutan atau tingkat kekeruhannya OD (*Optical Density*). Kepadatan dari biofilm pada media cair akan terbaca berdasarkan kekeruhannya (Seniati *et al.*, 2019). Pengukuran dengan spektrofotometer menjadi andalan bagi ilmu mikrobiologi. Pengukuran biofilm dilakukan pada panjang gelombang kisaran 595-600 nm. Panjang gelombang ini memungkinkan pengukuran absorbansi yang akurat pada populasi mikroba tanpa menimbulkan kerusakan dan gangguan pada tingkat molekul (Klopper *et al.*, 2020).

Hasil OD (*Optical Density*) dari pengukuran penghambatan biofilm oleh ekstrak etanol bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dengan menggunakan ELISA *reader* kemudian dianalisis menggunakan rumus persentase dan Uji *Anova One Way* dan Uji *Post Hoc LSD* pada aplikasi SPSS. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan efek anti pembentukan biofilm dalam beberapa konsentrasi ekstrak etanol bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Semakin besar konsentrasi ekstrak etanol bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) yang diberikan, semakin besar persentase penghambatan pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) diketahui mengandung flavonoid seperti quercetin, kaempferol, dan

asam hibiscus (Pimentel-Moral *et al.*, 2018). Flavonoid yang terkandung pada tanaman diketahui secara kuat dan secara langsung dapat mengganggu proses pembentukan amyloid dan serat fibril selulosa pada pembentukan biofilm, sehingga flavonoid menjadi senyawa yang mampu melawan pembentukan biofilm, khususnya pada bakteri yang biofilmnya terbentuk dari komponen amyloid dan serat fibril, seperti bakteri *Staphylococcus aureus* (Pruteanu *et al.*, 2020). Sebuah studi kontemporer oleh Junior *et al.*, (2018), menunjukkan dampak penghambatan dari quercetin pada produksi biofilm baik dalam referensi maupun isolat klinis bakteri *Staphylococcus aureus*. Quercetin pada konsentrasi mulai dari 250-500 g/mL sudah cukup untuk menurunkan hampir setengah dari biofilm *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap methicillin (MRSA) dan *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap vankomisin (VRSA). Quercetin diduga bekerja dengan cara menembus membrane bakteri, berinteraksi dengan komponen intraseluler, dan menginduksi stress oksidatif sehingga dapat membunuh mikroorganisme (Memariani, Memariani, & Ghasemian, 2019). Lee *et al.*, (dalam Memariani, Memariani, & Ghasemian, 2019) menyebutkan bahwa quercetin menekan ekspresi dari gen *quorum sensing agrA* dan ekspresi dari gen pengatur virulensi yaitu gen *sigB* dan *sarA*. O’Gara (dalam Memariani, Memariani, & Ghasemian, 2019) menyatakan bahwa quercetin sebanyak 10 g/mL dapat secara efisien menekan ekspresi gen adhesi seperti *icaA* dan *icaD* yang keduanya terlibat dalam pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Lee *et al.*, (dalam Nguyen dan Bhattacharya, 2022) menyatakan bahwa flavonoid jenis quercetin menghambat pertumbuhan biofilm MRSA dengan cara menekan ekspresi dari gen adhesi bakteri. Vanaraj *et al.*, (dalam Nguyen dan Bhattacharya, 2022) menemukan bahwa

nanopartikel perak quercetin secara efektif menghambat ekspresi virulensi dari gen MRSA.

Takó *et al.* (2020) menyebutkan bahwa senyawa metabolit sekunder fenol dapat menunjukkan aktivitas anti biofilm. Senyawa fenolik menekan pembentukan biofilm bakteri dengan cara menghambat mekanisme regulasi dari biofilm. Fenol dapat memblokir sinyal *quorum sensing*, mengurangi motilitas bakteri, mengurangi adhesi superfisial, dan menghambat ekspresi faktor virulensi yang berkaitan dengan sifat patogen bakteri. Asam fenolik terbukti efektif dalam melawan pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Asam galat, *ginkgolic*, *ellagic*, dan *rosmarinic* telah ditemukan sebagai senyawa fenolik yang menjadi penghambat dalam pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan penelitian Hamzah *et al* (2019), dilaporkan bahwa tannin 1% dapat mendegradasi biofilm dari bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* sebanyak 50%. Hal ini menunjukkan bahwa tannin dapat menghambat pembentukan biofilm polimikroba. Tannin dapat memecah lendir dari biofilm polimikroba dan merusak komunikasi sel antara bakteri dan jamur sehingga pertumbuhan biofilm dapat berkurang secara bermakna.

Penelitian ini sejalan dengan penelitian Jaddoa dan Gharb pada tahun 2021, yang memberikan hasil bahwa ekstrak etanol bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) dengan metode *microtiter plate* dapat menghambat pertumbuhan biofilm MRSA atau *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Penelitian tersebut menyebutkan bahwa dengan bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 80% dapat efektif menghambat biofilm MRSA dengan konsentrasi ekstrak etanol bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) sebesar 10 mg/mL. Penelitian

oleh Salman, Hassan, dan Ali (2020) menyatakan bahwa senyawa alkaloid yang didapatkan dari ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) memiliki peran besar sebagai antibiofilm pada biofilm bakteri MRSA yang didapatkan dari isolat klinis yang berbeda. Biofilm MRSA yang dikategorikan sebagai *strong biofilm former* (SBF), ketika ditambahkan alkaloid dari ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*), menunjukkan hasil bahwa biofilm MRSA bukan lagi dalam kategori SBF. Senyawa alkaloid dapat mengganggu proses perlekatan bakteri pada permukaan yang merupakan langkah awal pembentukan biofilm.

Penelitian yang dilakukan oleh Loresta, Murwani, dan Trisunuwati pada tahun 2019, yang menguji penghambatan biofilm *Staphylococcus aureus* menggunakan daun kelor (*Moringa oleifera*) yang mengandung bahan metabolit sekunder tannin dan flavonoid juga menunjukkan adanya efek antibiofilm terhadap biofilm *Staphylococcus aureus*. Hasil penelitian lain oleh Utami, Noorhamdani, dan Rahayu (2020) menggunakan bahan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang juga mengandung tannin, flavonoid, dan alkaloid, juga memberikan efek terhadap penghambatan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Nwanekwu (2020) menjelaskan bahwa ekstrak tanaman rosela (*Hibiscus sabdariffa*) merupakan bahan yang berperan kuat sebagai antibakteri dan penghambat biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, dan dari lima bahan yang diteliti, ekstrak rosela (*Hibiscus sabdariffa*) memiliki aktivitas penghambatan biofilm terbesar. Ekstrak tersebut diduga memiliki senyawa yang berperan sebagai penghambat sinyal kuorum sensing yang digunakan saat pembentukan biofilm. Hasil ini memiliki arti bahwa potensi ekstrak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai bahan

penghambat pertumbuhan biofilm tidak terbatas pada bakteri gram positif, tetapi juga pada bakteri gram negatif.