

## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* isolat klinis dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara *in vitro*. Simplisia pegagan yang digunakan didapatkan langsung dari Materia Medica, Batu dan telah tersertifikasi melalui surat determinasi yang dikeluarkan langsung oleh pihak Materia Medica. Sampel bakteri yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sampel swab luka pasien diabetes. Sampel swab luka kemudian diidentifikasi dengan menggunakan pewarnaan gram, penanaman pada media BAP, penanaman pada media MSA, uji katalase, dan uji koagulase untuk menemukan bakteri *Staphylococcus aureus* isolat klinis. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang didapatkan dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya, juga digunakan dalam penelitian ini sebagai pembanding.

Proses ekstraksi tanaman pegagan dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 90% (Vasavi *et al.*, 2016). Ekstraksi tanaman pegagan berguna untuk memperoleh suatu bahan aktif yang tidak diketahui, memperoleh suatu bahan aktif yang sudah diketahui, memperoleh sekelompok senyawa yang struktur sejenis, memperoleh semua metabolit sekunder dari suatu bagian tanaman dengan spesies tertentu, serta mengidentifikasi semua metabolit sekunder yang terdapat dalam suatu makhluk hidup sebagai penanda kimia atau kajian metabolisme (Endarini, 2016). Pemilihan etanol sebagai pelarut yang digunakan dalam mengekstraksi pegagan dalam penelitian ini adalah karena zat aktif penghambat pembentukan

biofilm yang terkandung dalam pegagan, yaitu kaempferol dan *asiatic acid* dapat diperoleh secara maksimal dengan menggunakan pelarut etanol (Nuurul *et al.*, 2020). Setelah melakukan ekstraksi tanaman pegagan dengan menggunakan simplisia sebanyak 200 gram dengan pelarut etanol 90% sebanyak 2 L, didapatkan ekstrak kental sebanyak 26 gram.

Identifikasi sampel swab luka diabetes dilakukan dengan menggunakan pewarnaan gram, penanaman pada media BAP, penanaman pada media MSA, uji katalase, dan uji koagulase. Dari tujuh sampel yang diperoleh, didapatkan hasil isolat bakteri *S. aureus* pada sampel nomor tujuh. Hasil pewarnaan gram berupa bakteri berbentuk kokus berwarna ungu yang berkelompok menyerupai anggur. Didapatkan hasil penanam pada media BAP (**Gambar 5.3**) berupa koloni berbentuk bulat, halus, terangkat, mengkilat, berwarna putih keemasan, dan membentuk zona hemolisis. *S. aureus* menghasilkan berbagai macam derajat hemolisis pada media agar darah karena memiliki toksin hemolisin (Jawetz *et al.*, 2019). Sedangkan pada media MSA (**Gambar 5.3**) didapatkan koloni berbentuk bulat, halus, terangkat, mengkilat, berwarna putih keemasan, dan mengubah warna media dari merah menjadi kuning karena bakteri *S. aureus* dapat memfermentasi mannitol (Todar, 2020). Kemudian dilanjutkan dengan uji katalase dan koagulase, didapatkan hasil positif pada kedua uji tersebut (**Gambar 5.5** dan **Gambar 5.6**). *S. aureus* memproduksi enzim katalase, yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, serta menghasilkan enzim koagulase, yang mana hal tersebut membedakannya dari *Staphylococcus epidermidis* (Todar, 2020).

Setelah isolat *Staphylococcus aureus* didapatkan dari sampel swab luka, dilanjutkan dengan melakukan uji pertumbuhan biofilm dengan metode *microtiter plate* secara kualitatif dan kuantitatif. Metode ini digunakan untuk menguji kemampuan bakteri untuk menempel pada permukaan *microtiter plate* di bawah suhu dan kondisi nutrisi yang ditentukan oleh peneliti (Haney *et al.*, 2021). Pada penelitian ini, didapatkan hasil uji pertumbuhan biofilm secara kualitatif yang menunjukkan kedua isolat *S. aureus*, baik klinis maupun ATCC dapat membentuk biofilm (**Gambar 5.12**). *Staphylococcus aureus* dapat menghasilkan biofilm berlapis-lapis yang tertanam di dalam glikokaliks atau lapisan lendir dengan ekspresi protein yang heterogen di seluruh bagiannya. Penelitian terdahulu, menggambarkan komponen padat utama glikokaliks terdiri dari asam teikoat (80%), *staphylococcal*, dan protein inang. Dalam studi lanjutan, antigen polisakarida spesifik bernama *Polysaccharide Intercellular Antigen* (PIA), berhasil diisolasi. PIA diproduksi secara *in vitro* dari *UDP-N-acetylglucosamine* melalui produk dari lokus *intercellular adhesive gene* (*ica*). Gen dan produk dari *ica* locus (*icaR* (regulator) dan *icaADBC* (*biosynthetic*) gen) telah terbukti berperan penting dalam pembentukan biofilm dan virulensi yang diregulasi sebagai respons terhadap pertumbuhan anaerobik (Archer *et al.*, 2011).

*S. aureus* mengekspresikan MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) yang mempunyai kapasitas untuk mengikat matriks protein manusia seperti fibrinogen dan fibronectin, serta sering menggabungkan kapasitas pengikatan untuk mengikat beberapa protein matriks yang berbeda. *S. aureus* memiliki kemampuan yang luar biasa untuk menempel

pada permukaan plastik (Otto, 2008). PIA merupakan molekul utama yang berperan dalam perlekatan intraseluler. PIA berfungsi sebagai “lem” yang bertugas melekatkan sel-sel melalui interaksi elektrostatis. Selain PIA, komponen lain yang memiliki peran penting dalam bentukan biofilm *S. aureus* adalah *staphylococcal accessory regulator (sarA)* dan *accessory gene regulator (agr)*. *sarA* dan *agr* adalah regulator yang saling melengkapi, di mana *sarA* menginduksi terjadinya perlekatan awal dan pematangan, dan juga permulaan terbentuknya biofilm dengan mengekspresikan enzim ekstraseluler nukleolitik dan proteolitik. Saat populasi quorum yang dimiliki biofilm signifikan, *agr* akan meningkatkan jumlah faktor virulensi untuk memerangi respon imun hospes serta mendukung penyebaran infeksi berikutnya (Archer *et al.*, 2011). Protein penting lain yang dimiliki oleh *S. aureus*, yaitu *biofilm-associated protein (Bap)*, memiliki peran dalam perlekatan pada permukaan *polystyrene*, adhesi antar sel, dan pembentukan biofilm (Otto, 2008).

Setelah itu dilanjutkan dengan uji pertumbuhan biofilm secara kuantitatif, hasil pertumbuhan dihitung dengan membandingkan nilai OD<sub>cut</sub> dengan nilai OD pertumbuhan. Menurut penelitian yang telah dilakukan Singh *et al.*, pada tahun 2017 pertumbuhan biofilm diklasifikasikan menjadi empat kategori (**Tabel 5.1**). Hasil perhitungan OD menjadikan *S. aureus* isolat klinis yang didapatkan dari sampel swab luka pasien diabetes masuk ke dalam kategori *Strong Biofilm-Former (SBF)*. Sedangkan untuk *S. aureus* ATCC masuk ke dalam kategori *Moderate Biofilm-Former (MBF)*. Pembentukan biofilm oleh *S. aureus* dipengaruhi berbagai macam faktor yang di antaranya adalah faktor lingkungan seperti gula (glukosa

dan/atau laktosa) atau protease yang ada dalam media pertumbuhan, serta bergantung pada susunan genetik dari isolat *S. aureus* tertentu (Melchior *et al.*, 2009). Kekuatan pembentukan biofilm *S. aureus* juga dikaitkan dengan garis keturunan MRSA, disfungsi agr, pigmentasi, dan beberapa faktor pasien (Luther *et al.*, 2018). Menurut penelitian terdahulu diperkirakan bahwa penilaian pembentukan biofilm dapat menjadi penanda yang berguna untuk menilai patogenisitas *S. aureus*. Mekanisme adhesi aktif *S. aureus* saat ini dianggap sebagai salah satu faktor virulensi yang penting dan sering dipertimbangkan untuk karakterisasi isolat klinis dalam studi patogenesis molekuler dan epidemiologi infeksi (Ghellai *et al.*, 2014).

Uji penghambatan biofilm *S. aureus* terhadap ekstrak pegagan dilakukan dengan menggunakan variasi konsentrasi mulai dari 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL, 16 mg/mL, 32 mg/mL dan 64 mg/mL. Pemilihan variasi konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini berdasar pada nilai Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) *S. aureus*. Penelitian terkait dengan nilai KHM ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap *S. aureus* isolat klinis yang didapatkan dari swab luka pasien diabetes telah dilakukan oleh Sutrisno *et al.* pada tahun 2014. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol pegagan memiliki nilai KHM sebesar 0,2 mg/mL. Pada penelitian ini, variasi konsentrasi dimulai dari sepuluh kali nilai KHM yaitu 2 mg/mL.

Metode yang digunakan pada uji penghambatan biofilm *S. aureus* terhadap ekstrak pegagan adalah metode *microtiter plate*. Hasil penelitian didapatkan dalam bentuk nilai *optical density* kepadatan biofilm *Staphylococcus aureus* setelah

ditambahkan berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urb.) yang dibaca dengan menggunakan ELISA reader (**Tabel 5.2** dan **Tabel 5.3**). Data yang diperoleh kemudian diolah dengan menggunakan aplikasi *Microsoft Excel* 2016 dan *SPSS for windows 23.0*. Pada penelitian ini, ekstrak etanol pegagan dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* baik ATCC maupun isolat klinis. Pada konsentrasi 2 mg/mL ekstrak pegagan sudah dapat menghambat pertumbuhan biofilm *S. aureus* isolat klinis sebesar 40,93% dan *S. aureus* ATCC sebesar 48,58%. Hasil penghambatan maksimal diperoleh dengan konsentrasi 64 mg/mL yang menghambat pembentukan biofilm hingga 75,90% pada *S. aureus* isolat klinis (**Gambar 5.16**), sedangkan pada *S. aureus* ATCC dapat menghambat hingga 79,27% (**Gambar 5.17**). Dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, diperoleh hasil penghambatan yang lebih optimal. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) efektif menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* dengan nilai *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) 2 mg/mL.

Seluruh tanaman *C. asiatica* telah diakui aktivitas biologisnya, serta banyak zat fitokimia yang terkandung di dalamnya, seperti alkaloid, flavonoid, asam fenol, triterpene, glikosida, tannin, dan masih banyak lagi senyawa lain yang terkandung di dalamnya (Biswas *et al.*, 2021). Kaempferol merupakan salah satu jenis senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm pada *S. aureus* (Slobodníková *et al.*, 2016). Penelitian sebelum yang telah dilakukan oleh Cho *et al.* (2015) menyatakan bahwa kaempferol memiliki kemampuan yang efektif dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.*

*aureus* hingga > 90%. Mekanisme kerja flavonoid dalam menghambat pembentukan biofilm yaitu dengan cara menghambat proses *quorum sensing* pada bakteri. Selain itu, flavonoid bekerja dengan cara interaksi fitokimia dengan protein dan struktur dinding sel bakteri, dan menyebabkan terjadinya kerusakan pada membran sitoplasma dengan mengurangi fluiditas membrane, serta beberapa flavonoid menunjukkan penghambatan proses sintesis asam nukleat, sintesis dinding sel dan metabolisme energi (Lahiri *et al.*, 2019). Gen *ica* merupakan gen pengkode PIA yang memiliki peran penting dalam pembentukan biofilm (M. Liu *et al.*, 2017). Penelitian yang telah dilakukan oleh Slobodníková *et al.*, 2016 menyatakan bahwa senyawa flavonoid dan tannin memiliki kemampuan untuk menekan regulasi dari gen *ica* sehingga terjadi penurunan produksi PIA. Penurunan produksi PIA menyebabkan terjadinya agregasi interseluler sehingga proses maturasi biofilm terganggu. Ketika proses maturasi terganggu, maka proses selanjutnya dalam siklus biofilm juga akan terganggu. Vasavi *et al.*, pada tahun 2016 juga menyatakan bahwa ekstrak etanol *Centella asiatica* mampu menghambat pembentukan biofilm *P. aeruginosa* sebesar sebesar > 80% dengan cara menghambat proses *quorum sensing* bakteri.

*Asiatic acid* merupakan salah satu jenis senyawa terpenoid yang terkandung dalam pegagan (Biswas *et al.*, 2021). Senyawa triterpenoid yang paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik (Endarini, 2016). *Asiatic acid* termasuk dalam golongan triterpenoid pentasiklik yang memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm (Sycz *et al.*, 2021). Menurut penelitian terdahulu *Asiatic acid* memiliki kemampuan untuk menghambat sintesis EPS pada biofilm bakteri. Di

bawah pengaruh *Asiatic acid*, terjadi penurunan aktivitas metabolisme bakteri yang hidup dalam biofilm spesies tunggal pada semua tahap pembentukannya, serta pada bakteri Gram-negatif dan Gram-positif *Asiatic acid* menunjukkan aktivitas antibiofilm saat pembentukan dan pemberantasan pada biofilm spesies tunggal (Sycz *et al.*, 2021). Kepekaan bakteri terhadap *Asiatic acid* dapat dikaitkan dengan disintegrasi membran, hal ini dibuktikan dengan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Liu *et al.* (2015) yang menyatakan bahwa *Asiatic acid* menyebabkan kerusakan membran pada bakteri Gram-negatif (*E. coli O157:H7*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*) dan bakteri Gram-positif (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*).