

DOI: <http://dx.doi.org/10.33846/sf13nk360>

Efektivitas Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus*

Ilma

Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; ilma.bawedan@gmail.com (koresponden)

Diah Titik Mutiarawati

Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; dihtitikmutiarawati@gmail.com

Suliati

Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Surabaya; suli_ati@rocketmail.com

ABSTRACT

Staphylococcus aureus has been the cause of a variety of community and nosocomial infections in humans, including folliculitis, impetigo, sepsis, endocarditis, osteomyelitis, implant-associated biofilms, and is also a major cause of recurrent infections in chronic wounds. This bacterium has a high efficiency in forming biofilms which results in continuous infection. One of the virulence factors of *Staphylococcus* is biofilm, which has the function of facilitating persistence in the host's body and weakening the host's defense system, resulting in resistant bacteria to high concentrations of antimicrobials. *Centella asiatica* (L.) Urb. or commonly known by the common name gotu kola, is a type of medicinal plant that has been used for a long time to treat and treat disease. *Centella asiatica* has various types of secondary metabolites that are able to effectively inhibit the formation of biofilms on bacteria. The purpose of this study was to determine the effectiveness of gotu kola ethanol extract as an inhibitor of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. This type of research was a true experimental laboratory conducted in vitro with the microtiter dish assay method. The results obtained in this study were in the form of optical density values for biofilm density which were then processed using the SPSS application. The results showed that gotu kola extract was effective in inhibiting the formation of *S. aureus* ATCC 25923 biofilms as well as clinical isolates. The conclusion of this study is that the ethanol extract of *Centella asiatica* (L.) Urb can inhibit the formation of *Staphylococcus aureus* biofilms with an MBIC value of 2 mg/mL.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; biofilms; gotu kola

ABSTRAK

Staphylococcus aureus telah menjadi penyebab beragam infeksi pada manusia yang bersifat komunitas dan nosokomial, termasuk folikulitis, impetigo, sepsis, endokarditis, osteomielitis, biofilm terkait implant, dan juga merupakan salah satu penyebab utama infeksi yang berulang pada luka kronis. Bakteri ini memiliki efisiensi yang tinggi dalam membentuk biofilm yang mengakibatkan infeksi terjadi secara terus menerus. Salah satu faktor virulensi dari *Staphylococcus* adalah biofilm, yang memiliki fungsi memfasilitasi persistensi dalam tubuh *host* dan melemahkan sistem pertahanan *host*, sehingga mengakibatkan bakteri resisten pada antimikroba dengan konsentrasi tinggi. *Centella asiatica* (L.) Urb. atau yang biasa dikenal dengan nama umum pegagan, merupakan salah satu jenis tumbuhan obat yang telah digunakan sejak lama untuk mengobati dan mengatasi penyakit. Pegagan memiliki berbagai jenis zat metabolit sekunder yang mampu menghambat pembentukan biofilm pada bakteri secara efektif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol pegagan sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Jenis penelitian ini adalah *true experimental* laboratoris yang dilakukan secara *in vitro* dengan metode *microtiter dish assay*. Hasil yang didapatkan pada penelitian berupa nilai *optical density* kepadatan biofilm yang kemudian diolah menggunakan aplikasi SPSS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak pegagan efektif dalam menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* ATCC 25923 maupun isolat klinis. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* dengan nilai MBIC 2 mg/mL.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*; biofilm; pegagan

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus telah menjadi penyebab beragam infeksi pada manusia yang bersifat komunitas dan nosokomial, termasuk folikulitis, impetigo, sepsis, endokarditis, osteomielitis, biofilm terkait implant, dan juga merupakan salah satu penyebab utama (65%) infeksi yang berulang pada luka kronis.^(1,2) Bakteri ini memiliki efisiensi yang tinggi dalam membentuk biofilm yang mengakibatkan infeksi terjadi secara terus menerus.⁽²⁾

Biofilm adalah kumpulan bakteri interaktif yang menempel pada permukaan padat atau satu sama lain dan terbungkus dalam matriks eksopolisakarida. Biofilm membentuk suatu mantel tipis pada permukaan padat sehingga bakteri yang terbungkus dalam matriks eksopolisakarida terlindung dari sistem imun *host*. Matriks eksopolisakarida memiliki fungsi sebagai penghalang difusi untuk beberapa antimikroba yang mengakibatkan infeksi sulit untuk diobati.⁽³⁾ Salah satu faktor virulensi dari *Staphylococcus* adalah biofilm, yang memiliki fungsi memfasilitasi persistensi dalam tubuh *host* dan melemahkan sistem pertahanan *host*, sehingga mengakibatkan bakteri resisten pada antimikroba dengan konsentrasi tinggi. Bakteri biofilm memiliki kemampuan 100-1000 kali relatif lebih resisten dibandingkan sel plankton bakteri.⁽⁴⁾ Biofilm juga merupakan salah satu faktor penting dalam infeksi manusia yang menyebabkan infeksi terjadi secara persisten dan sulit diobati.⁽³⁾

Studi terbaru menunjukkan bahwa metabolit sekunder tanaman memiliki kemampuan untuk mengganggu pembentukan biofilm.⁽⁵⁾ *Centella asiatica* (L.) Urb. (*C. asiatica*) atau yang biasa dikenal dengan nama umum pegagan, merupakan salah satu jenis tumbuhan obat yang telah digunakan sejak lama untuk mengobati dan mengatasi penyakit. Pegagan memiliki berbagai khasiat yang diantaranya adalah mengobati luka, mengatasi gangguan syaraf, dan menstimulasi sel otak.⁽⁶⁾ Beberapa penelitian in vitro dan in vivo menunjukkan bahwa ekstrak *C. asiatica* dan triterpenya sangat menjanjikan sebagai obat alami untuk mengurangi jerawat, menyembuhkan luka bakar, dermatitis atopik, dan luka terbuka.⁽⁷⁾ Kandungan senyawa triterpenoid saponin, yang diantaranya adalah *asiaticoside*, *asiatic acid*, *madecassic acid*, *madecassoside* pada *C. asiatica* memiliki efek antimikroba dan dapat meningkatkan aktivasi makrofag.⁽⁸⁾ Selain saponin, senyawa lain yang terkandung pada pegagan, seperti flavonoid dan tannin juga memiliki efek antimikroba.⁽⁹⁾

Penelitian yang telah dilakukan Nasution *et al.* pada tahun 2018, membuktikan bahwa *C. asiatica* memiliki efek antimikroba pada beberapa bakteri, yang diantaranya adalah *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus pyogenes*, dan *Streptococcus pneumoniae*.⁽¹⁰⁾ Menurut penelitian Vasavi *et al.* (2016) Ekstrak *C. asiatica* dapat menghambat pembentukan biofilm *P. aeruginosa* sebesar > 80% pada konsentrasi 400 µg/mL.⁽⁹⁾ Penelitian sebelum yang telah dilakukan oleh Cho *et al.* pada tahun 2015 menyatakan bahwa kaempferol yang merupakan salah satu jenis senyawa flavonoid yang terkandung dalam pegagan, memiliki kemampuan yang efektif dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S. aureus* hingga > 90%.⁽¹¹⁾

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* dan mengetahui nilai *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC)-nya. Ekstrak pegagan yang mengandung senyawa triterpene dan flavonoid diharapkan dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*.

METODE

Jenis penelitian ini adalah *true experimental* laboratoris yang dilakukan secara *in vitro* untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol pegagan dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode *microtiter dish assay*, sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design* untuk mengamati pertumbuhan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* setelah ditambahkan berbagai variasi ekstrak etanol pegagan.

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) dan bakteri *Staphylococcus aureus* isolat klinis yang didapatkan dari usap luka pasien diabetes di RUMAT Dharmahusada Spesialis Perawatan Luka Diabetes dan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang didapatkan dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Isolat bakteri diamati dengan menggunakan pewarnaan gram, penanaman pada media agar darah, penanaman pada media *mannitol salt agar* (MSA), uji katalase, dan uji koagulase.

Uji pertumbuhan biofilm dengan metode *microtiter dish assay* dilakukan dengan prosedur mengisi sumuran *microtiter plate* dengan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dalam media *Tryptic Soy Broth* + Glukosa 1% sebanyak 200 µL, setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator. Kemudian, semua cairan pada setiap sumuran dibuang, sehingga hanya ada biofilm yang melekat pada dinding sumuran saja, setiap sumuran dicuci dengan menggunakan PBS pH 7 sebanyak 200 µL, dilakukan sebanyak empat kali pengulangan, lalu dibuang. Setelah itu, menambahkan pewarna kristal violet 1% sebanyak 200 µL pada setiap sumuran, lalu ditunggu selama 15 menit dan dibuang, setiap sumuran dicuci dengan aquades steril sebanyak 200 µL, kemudian mengeringkan sumuran yang telah terwarnai dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang dalam keadaan steril. Lalu, asam asetat glasial 30% ditambahkan sebanyak 200 µL pada tiap sumuran untuk melarutkan kristal violet. Suspensi sebanyak 125 µL diambil dari sumuran yang telah ditambahkan asam asetat glasial, kemudian dipindahkan ke dalam sumuran yang baru dan diukur nilai *optical density*-nya menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm.⁽¹²⁾

Prosedur uji penghambatan biofilm dengan metode *microtiter dish assay* dilakukan dengan cara mengisi sumuran *microtiter plate* dengan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dalam media *Tryptic Soy Broth* + Glukosa 1% sebanyak 110 µL kemudian ditambahkan masing-masing 90 µL berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol pegagan yaitu 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL, 16 mg/mL, 32 mg/mL dan 64 mg/mL ke dalam tiap sumuran, setelah itu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator. Kemudian, semua cairan pada setiap sumuran dibuang, sehingga hanya ada biofilm yang melekat pada dinding sumuran saja, setiap sumuran dicuci dengan menggunakan PBS pH 7 sebanyak 200 µL, dilakukan sebanyak empat kali pengulangan, lalu dibuang. Setelah itu, menambahkan pewarna Kristal violet 1% sebanyak 200 µL pada setiap sumuran, lalu ditunggu selama 15 menit dan dibuang, setiap sumuran dicuci dengan aquades steril sebanyak 200 µL, kemudian mengeringkan sumuran yang telah terwarnai dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang dalam keadaan steril. Lalu, asam asetat glasial 30% ditambahkan sebanyak 200 µL pada tiap sumuran untuk melarutkan kristal violet. Suspensi sebanyak 125 µL diambil dari sumuran yang telah ditambahkan asam asetat glasial, kemudian dipindahkan ke dalam sumuran yang baru dan diukur nilai *optical density*-nya menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm.⁽¹³⁾

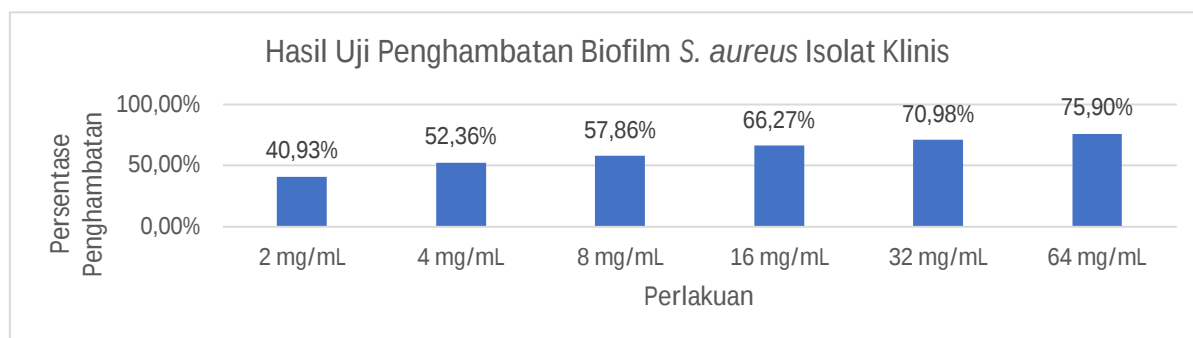
HASIL

Didapatkan hasil pewarnaan gram sampel berupa bakteri berbentuk bulat, berwarna ungu, dan tersusun dalam kelompok yang menyerupai bentuk anggur. Hasil penanaman pada media agar darah didapatkan koloni berbentuk bulat, halus, terangkat, mengkilat, berwarna putih keemasan, dan membentuk zona hemolisis,

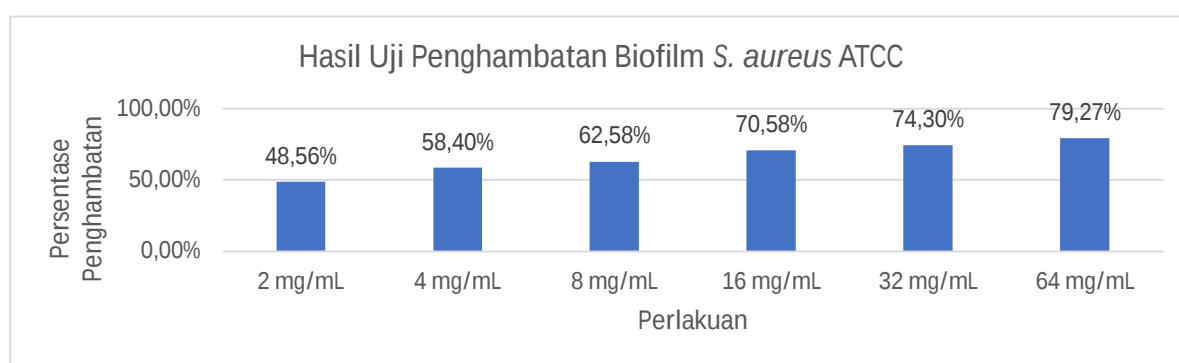
sedangkan pada media MSA didapatkan koloni berbentuk bulat, halus, terangkat, mengkilat, berwarna putih keemasan, dan mengubah warna media dari merah menjadi kuning. Didapatkan hasil positif pada uji katalase dan koagulase.

Uji pertumbuhan dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif untuk melihat kemampuan isolat dalam membentuk biofilm. Hasil uji pertumbuhan secara kualitatif menunjukkan kedua isolat *S. aureus*, baik klinis maupun ATCC dapat membentuk biofilm. Kemudian dilanjutkan dengan uji pertumbuhan secara kuantitatif, hasil pertumbuhan dihitung dengan membandingkan nilai ODcut dengan nilai OD pertumbuhan. Nilai ODcut didapatkan dengan cara: $OD_{cut} = OD_{avg \text{ of negative control}} + 3 \times \text{standard deviation (SD)}$.⁽¹⁴⁾ Pada penelitian ini didapatkan nilai ODcut sebesar 0,151. Singh *et al.*, pada tahun 2017⁽¹⁴⁾ mengklasifikasikan pertumbuhan biofilm menjadi empat kategori, yaitu: *Non-Biofilm-Former (NBF)* = $OD_{sampel} \leq OD_{cut}$, *Weak Biofilm-Former (WBF)* = $OD_{cut} < OD_{sampel} \leq 2 \times OD_{cut}$, *Moderate Biofilm-Former (MBF)* = $2 \times OD_{cut} < OD_{sampel} \leq 4 \times OD_{cut}$, *Strong Biofilm-Former (SBF)* = $OD_{sampel} > 4 \times OD_{cut}$. Pada penelitian ini didapatkan nilai $2 \times OD_{cut}$ sebesar 0,301 dan nilai $4 \times OD_{cut}$ sebesar 0,602. Hasil perhitungan OD *S. aureus* isolat klinis memiliki nilai sebesar 1,980. Hal tersebut 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, didapat hasil perhitungan nilai OD sebesar 0,536, yang berarti *S. aureus* ATCC masuk ke dalam kategori *Moderate Biofilm-Former (MBF)*.

Setelah dilakukan uji penghambatan pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* isolat klinis dan ATCC menggunakan ekstrak pegagan dengan variasi konsentrasi mulai dari 2 mg/mL, 4 mg/mL, 8 mg/mL, 16 mg/mL, 32 mg/mL, 64 mg/mL, kontrol positif yang berisi suspensi bakteri *S. aureus*, dan kontrol negatif yang berisi TSB + glukosa 1%, didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol pegagan memiliki kemampuan yang baik dalam menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*, baik isolat klinis maupun ATCC. Pada konsentrasi 2 mg/mL pegagan sudah bisa menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* isolat klinis sebesar 40,93%, penghambatan optimal didapatkan pada konsentrasi 64 mg/mL yaitu sebesar 75,90%. Sedangkan pada *S. aureus* ATCC pada konsentrasi 2 mg/mL pegagan dapat menghambat pembentukan biofilm sebesar 48,56% dan pada konsentrasi 64 mg/mL sebesar 79,27%.



Gambar 1. Diagram batang persentase hasil uji penghambatan biofilm *S. aureus* isolat klinis



Gambar 2. Diagram batang persentase hasil uji penghambatan biofilm *S. aureus* ATCC

Persentase penghambatan didapatkan dengan cara menghitung nilai OD kontrol positif dikurangi dengan nilai OD penghambatan, kemudian dibagi dengan nilai OD kontrol positif. Dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, diperoleh hasil penghambatan yang lebih optimal. Berdasarkan hasil analisis statistik nilai *optical density* kepadatan biofilm bakteri *S. aureus*, baik isolat klinis maupun ATCC, setelah ditambahkan variasi konsentrasi ekstrak pegagan dengan menggunakan uji ANOVA *one way*, didapatkan nilai p sebesar 0,000 untuk bakteri *S. aureus* isolat klinis dan ATCC. Hal tersebut berarti bahwa terdapat minimal dua kelompok data yang memiliki perbedaan nilai *optical density* secara signifikan. Hasil uji *Post Hoc Multiple Comparison* dengan metode uji *Least Significant Difference (LSD)* didapatkan nilai p sebesar 0,000 pada masing-

masing kelompok perlakuan untuk bakteri *S. aureus* isolat klinis dan ATCC, maka dari itu perbedaan dianggap signifikan.

PEMBAHASAN

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 *icaADB* (*biosynthetic*) gen) telah terbukti berperan penting dalam pembentukan biofilm dan virulensi yang diregulasi sebagai respons terhadap pertumbuhan anaerobik.⁽¹⁵⁾

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.⁽¹⁶⁾ 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.⁽¹⁵⁾ 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.⁽¹⁶⁾

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.⁽¹⁷⁾ Kekuatan pembentukan biofilm *S. aureus* juga dikaitkan dengan garis keturunan MRSA, disfungsi *agr*, pigmentasi, dan beberapa faktor pasien.⁽¹⁸⁾ 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.⁽¹⁹⁾

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.⁽²⁰⁾ Kaempferol merupakan salah satu jenis senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm pada *S. aureus*.⁽²¹⁾ 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%.⁽¹¹⁾ 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.⁽⁵⁾ Gen *ica* merupakan gen pengkode PIA yang memiliki peran penting dalam pembentukan biofilm.⁽²²⁾ Penelitian yang telah dilakukan oleh Slobodniková *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 pematangan biofilm terganggu. Ketika proses pematangan terganggu, maka proses selanjutnya dalam siklus biofilm juga akan terganggu. Vasavi *et al.*, pada tahun 2016⁽⁹⁾ 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.⁽²⁰⁾ Senyawa triterpenoid yang paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik.⁽²³⁾ *Asiatic acid* termasuk dalam golongan triterpenoid pentasiklik yang memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm.⁽²⁴⁾ 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.⁽²⁴⁾ 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*).⁽²⁵⁾

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* hingga > 70% dengan nilai Minimum Biofilm Inhibitory Concentration 2 mg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jayakumar J, Kumar VA, Biswas L, Biswas R. Therapeutic applications of lysostaphin against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2021 Dec 8];131(3):1072–82. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14985>
2. Roy S, Santra S, Das A, Dixith S, Sinha M, Ghatak S, et al. *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection Compromises Wound Healing by Causing Deficiencies in Granulation Tissue Collagen. 2021;271(6):1174–85.
3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E [Internet]. 27th ed. 2019. Available from: <https://books.google.com/books?id=PumOCgAAQBAJ>
4. Qu Y, Daley AJ, Istivan TS, Garland SM, Deighton MA. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2010;9:1–12.
5. Lahiri D, Dash S, Dutta R, Nag M. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *J Biosci*. 2019;44(2).
6. Widiyastuti Y, Wahjoedi B, Januwati M. Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) Tumbuhan Berkhasiat Multi Manfaat. 2016. p. 1–122.
7. Park KS. Pharmacological Effects of *Centella asiatica* on Skin Diseases: Evidence and Possible Mechanisms. 2021 [cited 2021 Dec 30]; Available from: <https://doi.org/10.1155/2021/5462633>
8. Raudah S, Kamil, Winda L. Pengaruh Ekstrak Daun Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Pada Luka Penderita Diabetes Mellitus Secara Invitro. *J Med Karya Ilm Kesehat*. 2020;5(1):1–11.
9. Vasavi HS, Arun AB, Rekha PD. Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Microbiol Immunol Infect* [Internet]. 2016;49(1):8–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2014.03.012>
10. Nasution MY, Restuati M, Pulungan ASS, Pratiwi N, Diningrat DS. ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF CENTELLA ASIATICA LEAF AND ROOT EXTRACTS ON SELECTED PATHOGENIC MICRO-ORGANISMS. 2018 [cited 2021 Dec 8]; Available from: <https://scialert.net/abstract/?doi=jms.2018.198.204>
11. Cho HS, Lee JH, Cho MH, Lee J. Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. *Biofouling*. 2015;31(1):37–41.
12. Haney EF, Trimble MJ, Hancock REW. Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nat Protoc* 2021 165 [Internet]. 2021 Apr 28 [cited 2022 Mar 24];16(5):2615–32. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41596-021-00515-3>
13. Phuong NTM, Van Quang N, Mai TT, Anh NV, Kuhakarn C, Reutrakul V, et al. Antibiofilm activity of α -mangostin extracted from *Garcinia mangostana* L. against *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2017;10(12):1154–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.022>
14. Singh A, Prakash P, Achra A, Singh G, Das A, Singh R. Standardization and classification of in vitro biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Glob Infect Dis*. 2017;9(3):93–101.
15. Archer NK, Mazaitis MJ, William Costerton J, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445–59.
16. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Gram-Positive Pathog*. 2008;699–711.
17. Melchior MB, van Osch MHJ, Graat RM, van Duijkeren E, Mevius DJ, Nielen M, et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Vet Microbiol*. 2009 May 28;137(1–2):83–9.
18. Luther MK, Parente DM, Caffrey AR, Daffinee KE, Lopes V V, Martin ET, et al. Clinical and Genetic Risk Factors for Biofilm-Forming *Staphylococcus aureus*. 2018;
19. GHELLAI L, HASSAINE H, KLOUCHE N, KHADIR A, AISSAOUI N, NAS F, et al. Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *J Bacteriol Res*. 2014;6(1):1–6.
20. Biswas D, Mandal S, Chatterjee Saha S, Tudu CK, Nandy S, Batiha GES, et al. Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology, and toxicity of *Centella asiatica* (L.) Urban: A comprehensive review. *Phyther Res*. 2021;(August):1–31.
21. Slobodníková L, Fialová S, Rendecková K, Kováč J, Mučaji P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*. 2016;21(12):1–15.
22. Liu M, Wu X, Li J, Liu L, Zhang R, Shao D, et al. The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. *Food Control*. 2017 Mar 1;73:613–8.
23. Endarini LH. Farmakognosi dan Fitokimia. 2016.
24. Syycz Z, Tichaczek-goska D, Jezierska-domaradzka A. Are Uropathogenic Bacteria Living in Multispecies Biofilm Susceptible to Active Plant Ingredient — Asiatic Acid ? 2021;23(Figure 1).
25. Liu WH, Liu TC, Mong MC. Antibacterial effects and action modes of asiatic acid. *Biomed*. 2015;5(3):22–9.