

AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI AIR EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (*CENTELLA ASIATICA* L.) TERHADAP BAKTERI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Rosyunita*¹, Metta Octora¹, Nurmi Hasbi¹, Alifia Amanda Larasati¹, Lina Permatasari², Neneng Rachmalia Izzatul Mukhlisah²

¹Program Studi Pendidikan Kedokteran Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Mataram

²Program Studi Farmasi Kedokteran Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Mataram
Jl. Majapahit No.62, Mataram, Nusa Tenggara Barat. 83115

*Corresponding Author Email: rosyunita@unram.ac.id

ABSTRAK

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang bersifat patogen pada manusia. Bakteri ini memiliki morbiditas yang tinggi pada pasien dengan kekebalan tubuh yang lemah serta memiliki kemampuan resistensi yang tinggi terhadap beberapa jenis antibiotik. Maka usaha menemukan jenis antibiotik bagi bakteri ini sangat dibutuhkan. Pegagan (*Centella asiatica* L.) merupakan tanaman herba yang memiliki senyawa flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, terpenoid, fenol, dan glikosida. Senyawa-senyawa ini telah diketahui sebagai antibakteri. Pegagan telah dikonsumsi sebagai minuman herbal dan aman bagi manusia. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui dan menganalisis aktivitas antibakteri ekstrak etanol fraksi air pegagan terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Metode yang digunakan pada penelitian ini bersifat *true experimental laboratories* dan analisis pengaruh aktivitas antibakteri menggunakan uji *post-test only control group design*. Ekstraksi pegagan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, kemudian dilanjutkan dengan proses fraksinasi air. Hasil ekstraksi fraksinasi air dilakukan pengujian aktivitasnya terhadap bakteri *P. aeruginosa* dengan menggunakan metode difusi cakram. Konsentrasi ekstrak pegagan yang digunakan terdiri dari 5000 ppm, 7500 ppm, dan 10000 ppm. Kontrol positif menggunakan kolistin 10 μ g serta kontrol negatif menggunakan DMSO 10%. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak pegagan pada semua konsentrasi yang diuji mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dengan terbentuknya zona bening berturut-turut sebesar 1.46 mm, 1.66 mm dan 1.87 mm. Pada kontrol positif dengan kolistin membentuk zona bening sebesar 7.3 mm dan kontrol negatif DMSO 10% tidak membentuk zona bening. Hasil analisis statistika dengan Kruskal-Wallis menunjukkan bahwa terdapat pengaruh konsentrasi ekstrak fraksi air terhadap diameter zona hambat bakteri. Namun, pada uji Post hoc dengan Mann-Whitney menunjukkan bahwa seluruh konsentrasi tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Maka, penggunaan pelarut yang tepat pada proses fraksinasi memungkinkan untuk dapat menghasilkan senyawa yang efektif dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*.

Keyword: Antibakteri, MDR, Patogen, Pegagan, Pseudomonas

1. PENDAHULUAN

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif yang bersifat patogen oportunistik yang menyebabkan infeksi akut dan kronis dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi, terutama pada pasien dengan kekebalan tubuh yang rendah (Jurado-Martinet et al., 2021). Bakteri *P. aeruginosa* memiliki faktor virulensi yang terkait dengan sel dan ekstraseluler yang berkontribusi terhadap

patogenesisnya. Faktor virulensi dari patogen ini terdiri dari kemampuannya untuk membentuk biofilm, sistem quorum sensing, flagellin, pili, lipopolisakarida, dan protein membrane luar serta beberapa enzim yang dirilis untuk melumpuhkan inangnya (Jimenez et al., 2012). Menurut WHO, bakteri ini merupakan bakteri patogen yang dikategorikan sebagai “kritis” untuk dilakukan penelitian dan pengembangan antibiotik baru (Tacconelli et al., 2018). Pengembangan antibiotik baru dapat dieksplorasi dari sumber-sumber hayati atau bahan alam yang memiliki senyawa aktif, contoh tumbuhan yang banyak dieksplorasi adalah tumbuhan pegagan (*Centella asiatica*L).

Pegagan (*C. asiatica*. L) telah dilaporkan memiliki senyawa bioaktif seperti flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, terpenoid, fenol, glikosida (Yasurin et al., 2016). Untuk mendapatkan senyawa-senyawa tersebut perlu dilakukan ekstraksi dengan menggunakan metode dan pelarut tertentu. Metode yang sering digunakan adalah maserasi etanol dan dilanjutkan dengan fraksinasi pelarut lain. Jamansyah et al., (2020) melaporkan bahwa minyak atsiri dari pegagan memiliki konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) berturut-turut pada 50% dan 100% terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Hasil penelitian lain dari Indah et al., (2022) dengan rebusan daun pegagan sebagai bioreduktor dalam sintesis nanopartikel perak dapat menghambat bakteri *P. aeruginosa* sebesar 22,6 mm. Sandy et al., (2020) melaporkan bahwa pegagan yang dimaserasi dengan etanol 96% dan dilanjutkan dengan fraksinasi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air mampu menghambat bakteri *Escherchia coli* ATCC 25922. Pada penelitian Fatimah et al., (2022) melaporkan bahwa pegagan yang dimaserasi etanol 70% yang selanjutnya hasil ekstraksi tersebut diencerkan dengan air destilasi steril, pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dapat menghambat *P. aeruginosa*.

Berdasarkan laporan-laporan hasil penelitian tersebut, belum terdapat laporan penerapan metode yang sama untuk menguji ekstrak pegagan fraksi air terhadap bakteri *P. aeruginosa* isolate klinis. Penggunaan konsentrasi yang berbeda dengan metode yang sama juga terhadap bakteri *P. aeruginosa* belum terdapat laporannya. Maka tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui dan menganalisis apakah ekstrak etanol daun pegagan fraksi air dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* isolate klinis

2. METODE

Metode penelitian ini bersifat eksperimental dengan pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi air ekstrak pegagan terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Analisis hasil uji aktivitas antibakteri menggunakan analisis statistikan Kruskal Wallis.

Pembuatan Esktrak Etanol Pegagan

Sebanyak 400 gram simplisia pegagan diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10 pada bejana tertutup. Lama waktu perendaman 3x24 jam dan dilakukan pengadukan 2 kali sehari. Proses ini dilakukan pada suhu ruang dan tidak terkena matahari secara langsung. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kain mori, ampas pegagan dilakukan maserasi ulang dengan cara yang sama sebanyak 2 kali. Semua hasil maserasi digabung selanjutnya dilakukan proses evaporasi untuk diperoleh ekstrak kental dari pegagan.

Fraksinasi Ekstrak Etanol Pegagan dengan Air

Proses ini menggunakan fraksinasi cair-cair. Sebanyak 20 gram ekstrak pegagan hasil maserasi dilarutkan pada 200 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan n-heksan sebanyak 200 ml ke dalam larutan tersebut. Selanjutnya dimasukkan ke dalam corong pisah statif dan dikocok selama 5 menit kemudian, didiamkan sampai terbentuk lapisan fraksi n-heksan dan fraksi air kemudian dilakukan penyaringan terhadap kedua fraksi tersebut. Proses ini dilakukan berulang sampai didapatkan fraksi n-heksan berwarna jernih. Metode yang sama dilakukan untuk fraksi kloroform dan etil asetat. Kemudian ekstrak yang tersisa dilakukan penguapan menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan hasil fraksi air yang kental. Ekstrak ini kemudian disimpan pada freezer dengan suhu -80°C untuk dilakukan pengujian selanjutnya.

Ekstrak kering yang telah ada dilakukan penimbangan dan dilarutkan pada DMSO 10% untuk membuat seri konsentrasi yang diuji. Seri konsentrasi tersebut terdiri dari 5000 ppm, 7500 ppm dan 10000 ppm. Pada penelitian ini digunakan colistin $10\ \mu\text{g}$ sebagai kontrol positif dan DMSO 10% untuk kontrol negatif. Tahap selanjutnya memasukan kertas cakram steril dan kosong pada larutan seri konsentrasi tersebut. Hal yang sama juga dilakukan pada kontrol baik positif maupun negatif.

Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Air

Bakteri *P. aeruginosa* merupakan isolate klinis yang diperoleh dari salah satu rumah sakit di Mataram. Sebelum diremajakan bakteri terlebih dilakukan pemeriksaan gram untuk konfirmasi jenis bakteri. Bakteri ini diremajakan dengan menggunakan media pertumbuhan Mac conkey. Media pertumbuhan yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA). Bakteri yang telah diremajakan dan dikonfirmasi spesiesnya sebagai *P. Aeruginosa* dibuatkan suspensinya. Satu ose bakteri hasil peremajaan dimasukan ke dalam larutan NaCl fisiologis dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Keekeruhan bakteri distandarisai dengan 0.5 ml McFarland dengan cara disejajarkan pada kertas putih bergaris hitam. Langkah selanjutnya mengambil suspensi bakteri yang telah distandarisasi menggunakan satu kapas swab, ditekan pada pinggir tabung untuk mengurangi basah lalu diratakan pada cawan petri yang telah berisi media MAH padat steril. Pada penelitian pengujian aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan 5 kali pengulangan.

Kertas cakram kosong steril yang telah direndam pada seri konsentrasi, kontrol positif, dan kontrol negatif dimasukan ke dalam cawan petri yang telah berisi media MAH dan bakteri. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk melihat aktivitas ekstrak terhadap bakteri. Terbentuknya zona bening mengindikasikan bahwa ekstrak pegagan mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Pengukuran zona bening dilakukan dengan menggunakan penggaris skala milimeter.

Analisis Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Pegagan

Adapun analisis uji aktivitas antibakteri menggunakan uji Kruskal Wallis dan uji lanjut menggunakan uji Mann Whitney.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas antibakteri

Pada penelitian ini menggunakan semua bagian dari herba mulai dari akar hingga daun. Aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh pegagan disebabkan oleh keberadaan

senyawa bioaktif yang ada pada herba tersebut. Namun, jumlah senyawa bioaktif pada pegagan tersebut relatif kecil, maka pemilihan metode ekstraksi harus cermat untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dari ramuan tersebut (Idris & Nazir, 2021). Pada metode ekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 120 menit pada suhu 60°C pada pegagan mampu mengeluarkan senyawa berupa madekasosida, asiaticosida, asam asiatic dan asam madekasik (Monton, et al., 2019). Pelarut etanol juga merupakan pelarut ekstraksi terbaik untuk menghasilkan antibakteri dari akar dan daun pegagan dibandingkan kloroform dan air (Nasution et al., 2018). Pada penelitian ini selain ekstraksi dengan etanol juga dilanjutkan dengan fraksinasi air untuk memperoleh aktivitas antibakteri yang terbaik. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi air terhadap bakteri *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Tabel 1 berikut.

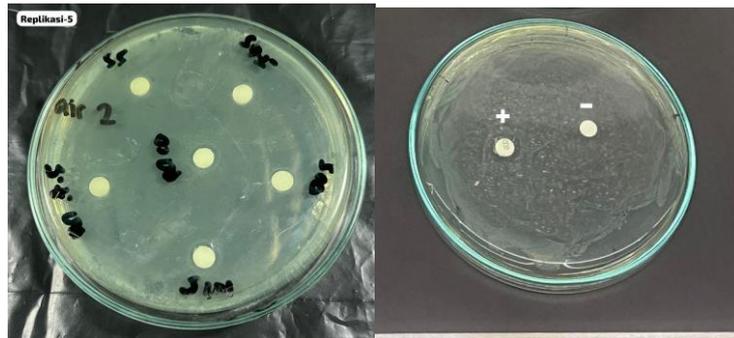
Tabel 1. Diameter zona hambat fraksi air terhadap *P. aeruginosa*

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata diameter zona hambat (mm)
5000	1.46
7500	1.66
10000	1.83
Kontrol positif Colistin	7.3
Kontrol negatif DMSO 10% (100000)	0

Berdasarkan hasil penelitian pada tabel 1 menunjukkan bahwa zona hambat terbesar dihasilkan oleh konsentrasi pegagan 10000 ppm sebesar 1.83 mm dan zona hambat terkecil dihasilkan oleh konsentrasi pegagan 5000 ppm. Dari hasil penelitian tersebut dapat dilihat bahwa semakin tinggi konsentrasi maka zona penghambatan juga semakin besar. Data tersebut menunjukkan juga bahwa perbedaan zona hambat pada semua seri konsentrasi fraksi air ekstrak pegagan lebih kecil dibandingkan kolistin sebagai kontrol positif. Namun, jika dilihat efektivitas antibakteri fraksi air pegagan pada semua seri konsentrasi dan kolistin sebagai kontrol positif maka zona hambat yang terbentuk sangatlah kecil bahkan dapat dikatakan bakteri resisten terhadap senyawa-senyawa tersebut. Fatima et al., (2019) menyatakan bahwa diameter zona hambat yang terbentuk untuk pengujian kolistin maupun senyawa lain terhadap bakteri *P. aeruginosa* jika ≤ 10 mm diinterpretasikan bahwa bakteri tersebut resisten.

antibiotik standar terhadap *P. aeruginosa* semakin meningkat

Bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri dengan kemampuan untuk meningkatkan level pertahanan terhadap antibiotik bahkan dikenal dengan *multi drug resistance* (MDR) (Coyne et al., 2022). *Pseudomonas aeruginosa* telah terbukti memiliki tingkat resistensi intrinsik yang tinggi terhadap sebagian besar antibiotik melalui terbatasnya permeabilitas membran luar, *efflux system* yang memompa antibiotik keluar dari sel dan produksi enzim yang menonaktifkan antibiotik seperti β -laktamase. Selain itu, resistensi antibiotik adaptif *P. aeruginosa* berupa mekanisme resistensi yang dimediasi oleh biofilm dan pembentukan sel persisten yang toleran terhadap beberapa obat, dan bertanggung jawab atas kekambuhan dan kekambuhan infeksi. (Pang et al., 2019).



Gambar 1. Aktivitas fraksi air Pegagan terhadap *P. Aeruginosa*

Analisis aktivitas antibakteri fraksi air pegagan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Berdasarkan hasil perhitungan dengan menggunakan uji statistika *post-test only control group design*, pada uji untuk mengetahui pengaruh konsentrasi terhadap diameter zona hambat menggunakan Kruskal-Wallis diperoleh hasil bahwa terdapat pengaruh konsentrasi fraksi air ekstrak pegagan terhadap besarnya diameter zona hambat bakteri *P. aeruginosa*. Hal ini sesuai dengan data pengamatan bawah semakin tinggi konsentrasi yang digunakan zona hambat yang dihasilkan juga semakin besar. Namun pada uji lanjut *Post hoc* dengan Mann-Whitney menunjukkan bahwa seluruh konsentrasi yang diujikan tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini sesuai juga dengan rata-rata perhitungan manual zona hambat pada cawan petri yang tingkat perbedaannya tidak signifikan.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, fraksi air ekstrak etanol pegagan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Namun, memiliki daya efektif yang kecil dalam menghambat bakteri tersebut. Pada analisis aktivitas dengan statistika Kruskal-Wallis dinyatakan bahwa terdapat pengaruh konsentrasi fraksi air ekstrak pegagan terhadap besarnya zona hambat pertumbuhan bakteri. Namun pada uji lanjut dengan Mann-Whitney dinyatakan bahwa seluruh konsentrasi tidak berbeda secara signifikan terhadap besarnya zona hambat bakteri.

5. DAFTAR REFERENSI

1. Coyne, A. J. K., El Ghali, A., Holger, D. Rebold, N., & Rybak, M. J. (2022). Therapeutic strategies for emerging Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Dis Ther.* 11, 661–682. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00591-2>
2. Fatima, N., Marwan, A., Anwar, A., Madhkhali, A., Ali, N., Gadi, A., Hasnany, A., Hamali, R., Ayyashi, M., & Hobani, Y. (2019). Effect of combined therapy on colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro study. *Advances in Microbiology*, 9, 877-892. [10.4236/aim.2019.910054](https://doi.org/10.4236/aim.2019.910054).
3. Jasmansyah., Fitriyani, P., Sujono, H., Aisyah, L. S. (2020). Uji aktivitas antimikroba minyak atsiri tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb). *J. Kartika Kimia*, 3, (1), 43-47. <https://doi.org/10.26874/jkk.v3i1.54>
4. Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., Quax, W.J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76 (1), 46–65. <https://doi.org/10.1128/mubr.05007-11>
5. Jurado-Martin, I., Sainz-Mejiaz, M., McClean, S. (2020). *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
6. Idris, F.N., & Nadzir, M. M. (2021). Comparative studies on different extraction methods of *Centella asiatica* and extracts bioactive compounds effects on antimicrobial activities. *Antibiotics*, 17,10 (4), 457. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040457>
7. Indah, Asri, M., Auliah, N., & Ashari, A. T. (2022). Sintesis nanopartikel perak dengan air rebusan daun pegagan (*Centella asiatica* L.) dan uji aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri

- Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. *Majalah Farmasi Dan Farmakologi*, 26(2), 88-91. <https://doi.org/10.20956/mff.v26i2.19903>
8. Monton, C., Settharaksa, S., Luprasong, C., Songsak, T. (2019). An optimization approach of dynamic maceration of *Centella asiatica* to obtain the highest content of four centelloids by response surface methodology. *Braz. J. Pharmacogn.* 29, 254-261. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.01.001>
 9. Nasution, M.Y., Restuati, M., Pulungan, A. S.S., Pratiwi, N., & Dinatingrat, D.S. (2018). Antimicrobial activities of *Centella asiatica* leaf and root extracts on selected pathogenic micro-organisms. *Journal of Medical Sciences*, 18, 198-204. <https://doi.org/10.3923/jms.2018.198.204>
 10. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T., & Cheng, Z. (2018). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177-192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
 11. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis*, 18 (3), 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
 12. Sandy, M., Wardani, T.S., Septiarini, A, D. (2020). Uji aktivitas antibakteri ekstrak fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. *Media Farmasi Indonesia*. 16(2). 1683-1692. <https://doi.org/10.53359/mfi.v16i2.184>
 13. Yasurin P., Sriariyanun, M., Phusantisampan, T. (2016). Review: The bioavailability activity of *Centella asiatica*. *Int. J. Appl. Sci. Technol*, 9 (1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.14416/j.ijast.2015.11.001>