

Efektivitas Nanoemulsi Gel Daun Pegagan (*Centella Asiatica L.*) Konsentrasi 25%, 50% Dan 75% Terhadap Ketebalan Biofilm Bakteri *Staphylococcus Aureus* (In Vitro)

¹Bunga Clarissa Soegiharto, ²Rosa Pratiwi, ³Erdianto Setya Wardhana

¹Program Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

²Departemen Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

³Departemen Ilmu Kesehatan Gigi Masyarakat Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung

*Corresponding Author:

rosapратиwi@unissula.ac.id

Abstrak

Penyakit periodontal adalah infeksi rongga mulut akibat dari bakteri berlebihan yang terdapat pada penumpukan plak. Salah satu bakteri penyebab yaitu Staphylococcus aureus. Staphylococcus aureus adalah mikroorganisme prokariotik yang tumbuh dan bertahan hidup sebagai komensal dan berubah menjadi patogen karena beberapa faktor prediposisi. Pegagan(Centella asiatica l.) merupakan tanaman herbal yang memiliki kandungan senyawa antibakteri yang dapat digunakan dalam bidang kesehatan. Tanin sebagai salah satu komponen kimia yang diketahui mempunyai aktivitas antibakteri terhadap Staphylococcus aureus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibakteri nanoemulsi daun pegagan konsentrasi 25%, 50%, dan 75% terhadap biofilm Staphylococcus aureus dengan perbedaan waktu inkubasi saliva. Metode penelitian ini berjenis eksperimental dengan post test only control group design dengan sampel berjumlah 24 yang dibagi menjadi 8 kelompok. Masing-masing kelompok diinkubasi 24 jam. Pembentukan biofilm diukur pada jam ke 4 dan ke 8 dengan menghitung Optical Density menggunakan ELLISA-reader. Hasil data rerata nilai optical density pada nanoemulsi daun pegagan konsentrasi 75% menghasilkan nilai yang paling rendah. Kemudian hasil dari perbedaan waktu inkubasi saliva menghasilkan nilai pada waktu 4 jam lebih rendah dibandingkan waktu 8 jam dalam semua kelompok percobaan. Hasil Kruskal-Wallis diperoleh $p=0,110$ ($p>0,05$) yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan ketebalan biofilm pada masing-masing kelompok. Penelitian ini menunjukkan bahwa nanoemulsi daun pegagan konsentrasi 75% memiliki efek antibakteri paling efektif dalam menurunkan ketebalan biofilm bakteri Staphylococcus aureus.

Kata kunci : *Staphylococcus aureus, biofilm, , Centella asiatica, optical density*

Abstract

Periodontal disease is an infection of the oral cavity caused by an excessive of bacteria in plaque accumulation. Specifically, Staphylococcus aureus was an prokaryotic microorganism that grows and survives as a commensal and turns into a pathogen due to several predisposing factors. The leaves of pegagan (Centella asiatica l.) contains antibacterial substances that inhibit the growth of various types of bacteria. Tannins as one of the chemical components are known to have antibacterial activity. This study aims to determine the antibacterial effect of nanoemulsion gel leaves pegagan with various concentrations of 25%, 50%, and 75% against Staphylococcus aureus biofilms with differences incubation time of saliva. This research method was an experimental type with post test only control group design with a sample of 24 divided into 8 groups. Each group was incubated 24 hours. The biofilm formation was observed at 4 and 8 hours and measured by Optical Density using an ELISA-reader. The results of the average values on the nanoemulsion gel of leaves pegagan of 75% showed there was a lowest value. Then the difference of salivary incubation time resulted in a value at 4-hours lower than the 8-hours in all groups. The kruskal wallis results obtained $p=0,110$ ($p>0,05$), which showed that there were no differences in biofilm thickness in each group.

The conclusions of this research showed that formulation concentrations of 75% had most an antibacterial effect in reducing Staphylococcus aureus biofilms.
Keywords: *Staphyloccous aureus, biofilm, Centella asiatica, optical density*

1. PENDAHULUAN

Penyakit periodontal merupakan hasil interaksi antara invasi bakteri biofilm dengan imun host yang tidak adekuat. Menurut hasil RISKESDAS tahun 2018 prevalensi penyakit kesehatan gigi dan mulut di Indonesia sebanyak 57,6% dan berdasarkan aspek semua usia berkisar 20%-50%. Salah satu faktor lokal adanya penyakit periodontal yaitu akumulasi plak. Plak merupakan kumpulan dari akumulasi biofilm yang melekat pada permukaan gigi. Salah satu bakteri penyebab plak yaitu *Staphylococcus aureus*.

Pengendalian Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab plak dapat dilakukan dengan penggunaan tanaman herbal yang mengandung senyawa bahan antibakteri dalam bentuk sediaan nanoemulsi gel daun pegagan. Daun pegagan memiliki kandungan senyawa aktif seperti saponin, tanin, flavonoid, triterpenoid, dan minyak atsiri. Kandungan senyawa aktif tersebut terbukti dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam proses pembentukan plak. Kandungan senyawa aktif seperti flavonoid akan menghambat sintesis asam nukleat dan menghambat metabolisme energi pada bakteri., saponin berperan meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri menyebabkan donaturasi protein, dan triterpenoid berperan bereaksi dengan porin berikatan polimer yang kuat menyebabkan kekurangan bakteri nutrisi. Selain bahan herbal masih banyak dokter gigi menggunakan bahan kimia untuk upaya pengendalian plak yaitu *chlorhexidine gluconate 0,2%gel*.

Ekstrak daun pegagan yang dikombinasikan dengan formulasi gel efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penggunaan formulasi basis gel akan memudahkan dalam pengaplikasian penggunaan tanaman herbal pada terapi penyakit periodontal serta dapat meningkatkan stabilitas dari kandungan bahan herbal. Nanoemulsi merupakan sistem penghantaran suatu bahan aktif maupun obat yang terdiri atas fase air dan minyak yang distabilkan oleh surfaktan untuk meningkatkan kelarutan serta efek farmakologi dari suatu bahan herbal. Nanoemulsi memiliki beberapa keuntungan yaitu ukurannya yang sangat kecil berkisar 50-1000 nm memudahkan dalam laju penyerapan obat yang lipofilik terhadap tubuh serta menghindari adanya oksidasi dan hidrolisis karena bentuk sediannya minyak didalam air. Selain itu, nanoemulsi juga dapat menggabungkan obat lipofilik dan hidrofilik serta mengurangi efek samping dari pemakaian obat. Berdasarkan penjelasan tersebut penulis ingin melakukan penelitian untuk mengetahui efektivitas nanoemulsi gel daun pegagan (*centella asiatica l.*) terhadap ketebalan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* (*In Vitro*).

2. METODE

Penelitian berikut adalah penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* dengan rancangan penelitian *experimental post test only*. Jumlah sampel penelitian dihitung menggunakan rumus *Federer* yang didapatkan sebanyak 24 sampel. Jumlah sampel penelitian terdapat 4 kelompok yaitu kelompok nanoemulsi gel daun pegagan dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, *chlorhexidine gluconate 0,2% gel*. Setiap kelompok dibagi menjadi waktu inkubasi biofilm 4 jam dan 8 jam dengan masing-masing dilakukan 3 kali pengulangan.

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian untuk proses pembuatan nanoemulsi gel daun pegagan dan untuk uji ketebalan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.

Sebelum tahap penelitian, alat disterilisasikan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian didiamkan hingga mencapai suhu kamar dan suhu kering. Setelah itu, pengambilan saliva responden dengan metode *spitting out*. Pembuatan nanoemulsi gel daun pegagan diawali dengan pembuatan ekstrak daun pegagan menggunakan metode maserasi. Kemudian ekstrak tersebut diubah sedianya menjadi nanemulsi gel. Dilakukan pembiakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Diponegoro Semarang yang akan digunakan dalam penelitian tersebut.

Bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasikan pada media nutrisi agar (NA) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian dilakukan uji ketebalan biofilm dengan metode *microtiter plate biofilm assay*. *Mikroplate* yang telah steril dilapisi saliva kemudian diinkubasi pada suhu ruangan dengan waktu 4 jam dan 8 jam. Selanjutnya dibilas dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) kemudian diberi bakteri *Staphylococcus aureus* dan pengaplikasian nanoemulsi gel daun pegagan dengan berbagai konsentrasi (25%, 50%, 75%), diberikan *chlorhexidin gluconate* 0,2% gel sebagai kontrol positif negatif yang diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Setelah diinkubasi dilakukan pencucian dengan PBS dan *aquadest steril* serta pewarnaan menggunakan *crystal violet* 1% kemudian dilakukan pencucian kembali menggunakan *aquadest steril* dibiarkan sampai kering dan ditambahkan etanol 96% diinkubasi selama 15 menit dalam suhu ruangan. Kemudian akan dilakukan analisa hasil sampel dengan metode *ELLISA-reader*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian uji ketebalan biofilm menunjukkan nilai *optical density* sebagai berikut :

Tabel 1. Nilai Pembacaan nilai *optical density*(OD)

Perlakuan	Inkubasi saliva (jam)	Formulasi 25%	Formulasi 50%	Formulasi 75%	Kontrol (+)
1	4	1.217	0.727	0.657	3.275
2	4	1.354	1.219	1.322	3.421
3	4	2.222	1.914	1.351	3.435
4	8	3.228	3.411	3.275	3.494
5	8	3.727	3.209	3.198	3.450
6	8	3.809	3.310	3.180	3.444
Rata – rata		2.593	2.298	2.164	3.420

Berdasarkan hasil pembacaan nilai *optical density* biofilm *Staphylococcus aureus* didapatkan nilai rerata paling rendah yaitu kelompok nanoemulsi gel daun pegagan konsentrasi 75% dalam waktu inkubasi saliva 4 jam yang artinya memiliki kemampuan

keefektifan paling tinggi dalam menghambat ketebalan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.

Tabel 4.2. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Kelompok	N	Saphiro-Wilk	Levene
		Sig.	Sig.
Konsentrasi 25% (dalam 4 jam)	3	,901	,000
Konsentrasi 25% (dalam 8 jam)	3	,732	
Konsentrasi 50% (dalam 4 jam)	3	,834	
Konsentrasi 50% (dalam 8 jam)	3	,712	
Konsentrasi 75% (dalam 4 jam)	3	,148	
Konsentrasi 75% (dalam 8 jam)	3	,342	
Kontrol Positif (dalam 4 jam)	3	,557	
Kontrol Positif (dalam 8 jam)	3	,319	

Berdasarkan hasil data yang didapatkan kemudian dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas menggunakan metode *Saphiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji Levene. Hasil uji normalitas didapatkan semua kelompok data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Hasil uji homogenitas semua data di dapatkan data tidak homogen dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

Tabel 4.3. Rerata Nilai Standar Deviasi dan Uji Kruskal-Wallis

Kelompok	N	Mean	Std. Dev	Kruskal-Wallis(Sig.)
Konsentrasi 25% (dalam 4 jam)	3	2,255	,545	,110
Konsentrasi 25% (dalam 8 jam)	3	3,709	,110	
Konsentrasi 50% (dalam 4 jam)	3	1,584	,349	
Konsentrasi 50% (dalam 8 jam)	3	3,504	,010	
Konsentrasi 75% (dalam 4 jam)	3	1,229	,187	
Konsentrasi 75% (dalam 8 jam)	3	3,218	,050	
Kontrol Positif (dalam 4 jam)	3	3,469	,023	
Kontrol Positif (dalam 8 jam)	3	3,452	,042	

Berdasarkan hasil data tabel 4.3 didapatkan bahwa data berdistribusi normal dan tidak homogen, sehingga dilakukan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis* dengan nilai $p = 0,110$ di mana nilai $p > 0,05$ menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan ketebalan biofilm masing-masing kelompok penelitian.

Hasil nilai *optical density* pada penelitian mengenai efektivitas nanoemulsi gel daun pegagan terhadap ketebalan biofilm *Staphylococcus aureus* yang terbentuk pada kelompok nanoemulsi gel daun pegagan (*Centella asiatica l.*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, kelompok kontrol positif (*chlorhexidin gluconate* 0,2% gel) menunjukkan bahwa nanoemulsi gel daun pegagan konsentrasi 75% dalam waktu inkubasi 4 jam

memiliki efek antibakteri terbesar dalam menghambat ketebalan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.

Hasil penelitian tersebut sejalan dengan penelitian sebelumnya mengenai ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica l.*) konsentrasi 12,5% sudah efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal tersebut membuktikan bahwa semakin besar konsentrasi maka semakin besar zona hambat yang terbentuk dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Daun pegagan (*Centella asiatica l.*) memiliki beberapa kandungan senyawa aktif seperti triterpenoid, saponin, triterpenoid genin, minyak atsiri, flavonoid, fitosterol, dan kandungan senyawa aktif lainnya. Kandungan yang paling penting sebagai antibakteri yaitu triterpenoid, flavonoid dan saponin. Senyawa aktif antibakteri tersebut akan memengaruhi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan bakteri kekurangan nutrisi yang kemudian akan lisis.

Hasil penelitian pada perbedaan fase inkubasi saliva selama 4 jam dan 8 jam didapatkan hasil nilai *optical density* pada waktu inkubasi 4 jam lebih rendah dibandingkan waktu inkubasi 8 jam pada semua kelompok percobaan. Hal ini disebabkan karena pada inkubasi saliva 4 jam biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* masih tahap kolonisasi awal yang mudah dihambat dengan senyawa bioaktif antibakteri dari formulasi nanoemulsi gel daun pegagan (*Centella asiatica l.*).

Chlorhexidine merupakan salah satu *gold standard* dalam pencegahan akumulasi plak gigi yang mengandung zat anti bakteri. Hal tersebut dikarenakan, *chlorhexidine* memiliki efek bakteriostatik dan efek bakterisidal terhadap semua jenis bakteri, baik bakteri gram positif (+) maupun bakteri gram negatif (-). penggunaan *chlorhexidine* dalam jangka waktu lama menimbulkan efek samping pada rongga mulut yaitu ulserasi mukosa rongga mulut, perubahan warna pada gigi, perubahan rasa kecap pada lidah, mulut kering, dan perubahan keseimbangan flora normal rongga mulut.

Sedangkan inkubasi saliva selama 8 jam didapatkan hasil nilai OD lebih tinggi daripada inkubasi selama 4 jam karena pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* sudah melewati tahap maturasi plak sehingga daya hambat senyawa antibakteri kurang berpenetrasi kedalam matriks biofilm

4. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian mengenai efektivitas nanoemulsi gel daun pegagan (*Centella asiatica l.*) *chlorhexidine gluconate* 0,2% gel terhadap ketebalan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* (*in vitro*) dapat disimpulkan bahwa terdapat efektivitas paling unggul pada kelompok nanoemulsi gel daun pegagan konsentrasi 75%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih dan dukungan saya haturkan kepada Allah SWT dan pihak terkait yang membantu saya menyelesaikan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Arjuna, A. *et al.* 2018. Uji Pendahuluan Anti-Biofilm Ekstrak Teh Hijau dan Teh Hitam pada *Streptococcus mutans* melalui Metode Microtiter Plate. *Jurnal Farmasi Galenika*. 4(1). 44–49. doi: 10.22487/j24428744.2018.v4.i1.9965.
- Basavaraju, M. *et al.* 2016. Quorum Quenching: Signal Jamming in Dental Plaque Biofilms. *Journal of Dental Sciences*. Elsevier Taiwan LLC. 11(4). 349–352. doi: 10.1016/j.jds.2016.02.002.
- Berger, D. *et al.* 2018. Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High-Throughput*. 7(24). 1–8. doi: 10.3390/ht7030024.
- Lindhe, J. and Lang, N. P. 2015. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry Sixth Edition*. USA: Wiley Blackwell.
- Newman, M. G. *et al.* 2019. *Clinical Periodontology Thirteen Edition*. 13th edn. Philadelphia: Elsevier.
- Otto, M. 2018. Staphylococcal Biofilms. *Journal American Microbiological Spectrum*. 8(10). 1–17. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018.Correspondence.
- Agfadila, T., Sandhi, P. A. and Puspawati, N. N. 2017. Kemampuan Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 8739. *Jurnal ITEPA*. 6(2). 21–9.
- Azzahra, F. and Hayati, M. 2018. Uji Aktivitas Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal B-Dent*. 5(1). 9–19. doi: 10.33854/jbd.v5i1.133.
- Gurpreet, K. and Singh, S. K. 2018. Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 80(5). 781–789.
- Hassan, K. A. M. and Mujtaba, A. M. D. 2019. Antibacterial Efficacy of Garlic Oil Nano-Emulsion. *AIMS Agriculture and Food*. 4(1). 194–205. doi: 10.3934/AGRFOOD.2019.1.194.
- Khasanah, H. R., Welkriana, P. W. and Krisyanella, K. 2019. Effectiveness Test Antimicrobial Infusion Gotu Kola Leaf Extract (*Centella asiatica*) on The Growth *Staphylococcus aureus*. *Advances in Health Sciences Research (AHSR)*. 14(Icihc 2018). 136–139. doi: 10.2991/icihc-18.2019.34.
- Khoiriyah, H. *et al.* 2018. Formulation of Nano Spray Gel Bonggol Pisang Kepok (*Musa balbisiana* colla). *Prosiding Annual Pharmacy Conference*. 3. 47–53.
- Kusuma Yosi, Komang J. Putra Pinatih, Hendrayana M. A. 2019. Efek Sinergis Kombinasi Chlorhexidine dan Alkoholo terhadap Daya Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. 8(3). 139–146.
- Rondhianto, Wantiyah, and Putra, F. M. 2016. Penggunaan Chlorhexidine 0,2% dengan Povidone Iodine 1% Dekontaminasi Mulut terhadap Dekontaminasi Mulut Terhadap Kolonisasi *Staphylococcus aureus* pada Pasien Pasca Operasi Anastesi Umum. *NurseLine*. 1(1).

176–183.

Available

at:

<http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/245180/245180.pdf><https://hdl.handle.net/20.500.12380/245180><http://dx.doi.org/10.1016/j.jsames.2011.03.003><https://doi.org/10.1016/j.gr.2017.08.001><http://dx.doi.org/10.1016/j.precamres.2014.12.0>.