

BAB 6

PEMBAHASAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak mahkota bunga mawar (*Rosa indica*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Ekstrak mahkota bunga mawar tersebut sudah dibuktikan tidak mengandung etanol yang digunakan sebagai pelarut karena aroma etanol pada ekstrak sudah hilang dan ekstrak tidak tersulut saat disulut menggunakan api, sehingga penghambatan pembentukan biofilm murni terjadi karena efek dari ekstrak tersebut. Pemeriksaan dan identifikasi bakteri membuktikan bahwa isolat bakteri dalam penelitian ini adalah *S. aureus* pembentuk biofilm.

Biofilm adalah sekumpulan sel hidup yang membentuk mikrokoloni dan melekat pada suatu permukaan serta dilindungi *glycocalyx*, matriks ekstraselular polimerik yang diproduksi sendiri oleh organisme pembentuk biofilm, atau disebut juga *extracellular polymeric substance* (EPS). Sebagian besar volume biofilm berisi EPS. EPS berfungsi untuk memfasilitasi perlekatan, melindungi koloni dari neutrofil, menghindari deteksi fagosit, dan mengganggu antibodi serta faktor komplemen (Thomson, 2011; Davis et al., 2006). Pertumbuhan biofilm dipengaruhi oleh ekspresi gen-gen yang membuat *S. aureus* dapat beradaptasi pada berbagai permukaan benda. Tiga gen di antaranya mengkode enzim jalur glikolisis atau fermentasi, yaitu fosfoglisarat mutase, triosefosfat isomerase, dan alkohol dehidrogenase. Sedangkan dua gen lainnya mengkode enzim yang dapat membantu *S. aureus* beradaptasi pada keterbatasan nutrisi, yaitu threonyl-tRNA sintetase dan ClpC ATPase (Becker et al., 2001).

Sebelum melakukan penelitian, terlebih dahulu dilakukan uji eksplorasi untuk menentukan konsentrasi perlakuan yang tepat. Berdasarkan hasil penelitian eksplorasi diketahui bahwa pembentukan biofilm tidak dapat diamati lagi pada konsentrasi 35%. Dari angka ini dapat ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 0% (kontrol), 15%, 20%, 25%, 30% dan 35%. Jarak antar konsentrasi dibuat sama dan berurutan untuk memudahkan pembuatan larutan ekstrak. Selain itu jarak yang tidak terlalu dekat akan memperkecil kemungkinan kesalahan dalam pengambilan ekstrak.

Metode yang digunakan dalam uji hambat pembentukan biofilm ini adalah metode tabung. Metode tabung mempunyai sensitivitas 77.9% dan spesifisitas 96% (Mathur, 2006). Pengamatan biofilm dilakukan dengan dua cara, yaitu pengamatan langsung atau kualitatif untuk menentukan MBIC, dan pengamatan secara kuantitatif untuk melihat efek hambat masing-masing konsentrasi.

Pengamatan langsung dilakukan dengan mengamati cincin dan dinding berwarna ungu kebiruan pada tabung. Hasil pengamatan ini hanya dinyatakan dengan "pembentukan positif" (+) dan "pembentukan negatif" (-). Berdasarkan hasil pengamatan langsung ini, pada pengulangan 1, 2, 3 dan 4 didapatkan bahwa pada konsentrasi 35% sudah tidak didapatkan pembentukan biofilm lagi. Dari keseluruhan hasil tersebut dapat ditentukan besar *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) dengan melihat konsentrasi terkecil dimana sudah tidak didapatkan pembentukan biofilm pada semua pengulangan. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa MBIC ekstrak mahkota bunga mawar adalah sebesar 35%.

Pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur nilai intensitas warna hasil pengecatan tabung. Nilai ini dinyatakan dengan *Mean Gray Value* (MGV). Skala yang dapat ditunjukkan MGV adalah 0 sampai 255. Semakin mendekati angka 0 berarti intensitas warnanya semakin pekat, sebaliknya bila mendekati angka 255 berarti intensitas warnanya semakin tipis. Intensitas warna ini dapat digunakan sebagai indikator pembentukan biofilm pada tabung. Semakin pekat warna tabung menunjukkan semakin tebal permukaan biofilm, begitu pula sebaliknya (Roeselers *et al.*, 2007).

Hasil pengukuran MGV kemudian dianalisis dengan program SPSS 13.0. Uji statistik yang digunakan adalah *One Way ANOVA* dan uji korelasi *Pearson*. Dari uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi $p = 0,00$ ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan efek yang bermakna antara tiap konsentrasi ekstrak mahkota bunga mawar. Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan nilai $r = 0.885$, sehingga berarti korelasi antara ekstrak mahkota bunga mawar dan *Mean Gray Value* sangat kuat ($r > 0,75$). Korelasi yang positif menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak mahkota bunga mawar maka semakin besar MGV, yang berarti semakin rendah kepekatan warnanya dan semakin rendah pembentukan biofilmnya. Hal ini diduga disebabkan oleh kandungan flavonoid, terpena, dan tannin dalam ekstrak mahkota bunga mawar yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Secara keseluruhan, terpena dapat mengubah permeabilitas sel bakteri dengan merusak membran lipid bakteri, sehingga keseimbangan cairan dalam sel terganggu. Hal ini menyebabkan bentuk permukaan sel berubah, sehingga menyebabkan penempelan bakteri ke suatu permukaan terganggu dan biofilm tidak dapat terbentuk (Dalleau *et al.*, 2008). *Farnesol* dan *citronellol* adalah jenis terpena yang terdapat pada mahkota

bunga mawar. Kedua senyawa ini dapat menghambat sintesis matriks polisakarida dan merusak membran sel bakteri (Unnanuntana *et al.*, 2009). Flavonoid dapat menghambat perlekatan bakteri pada permukaan dan mengganggu permeabilitas dinding sel mikroorganisme dengan menghambat sintesis asam amino di porin (Alvarez *et al.*, 2008; Crespo *et al.*, 2008). Flavonoid yang ada pada mahkota bunga mawar adalah *kaempferol* dan *quercetin*. Senyawa-senyawa ini menghambat pertukaran sinyal kimia antar sel dalam komunitas atau *quorum sensing* yang berperan dalam regulasi ekspresi gen pembentuk biofilm sehingga biofilm tidak terbentuk (Vikram *et al.*, 2010). Tannin mampu melakukan inaktivasi adhesin, enzim, dan protein transpor serta merusak dinding sel bakteri, sehingga tannin dapat mencegah perlekatan bakteri pada permukaan maupun maturasi biofilm yang sudah terbentuk (Okuda, 2005). Tannin yang terkandung dalam mahkota bunga mawar adalah jenis tannin yang bisa terhidrolisis, seperti *gallic acid* dan *tannic acid* (Cai *et al.*, 2005). Tannin jenis ini dapat mencegah perlekatan bakteri dan memiliki efek bakteristatik dengan menghambat produksi matriks pembentuk biofilm serta merusak membran sitoplasma bakteri (Trentin *et al.*, 2013). Semua bahan aktif tersebut diduga saling membantu untuk mengganggu pembentukan biofilm.

Selain kandungan mahkota bunga mawar yang memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm, penelitian ini menggunakan mawar karena mawar telah dikenal dapat mengobati beberapa penyakit, seperti konstipasi dan hematuria (Parvathi *et al.*, 2012). Mawar juga mudah dibudidayakan dan sudah banyak yang melakukannya di Indonesia, sehingga bahan untuk membuat ekstrak mahkota bunga mawar tidak sulit didapat (Damayanti dan Fitriana, 2012). Ekstrak mahkota bunga mawar ini juga tercatat

tidak memiliki efek samping yang berarti jika dikonsumsi (Nickell, 1999). Sedangkan etanol yang digunakan sebagai pelarut juga hanya menimbulkan efek samping yang ringan jika mengalami kontak langsung dengan manusia, seperti iritasi dan alergi (Equistar, 2003). Ekstrak mahkota bunga mawar ini dapat digunakan sebagai salep untuk menggantikan salep antibiotik yang sudah ada, misalnya dioleskan pada kateter sebelum pemasangan, untuk mencegah terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang selama ini biasa digunakan.

Kelemahan penelitian pembentukan biofilm yang menggunakan metode tabung ini adalah tidak dapat membedakan apakah bakteri pembentuk biofilm yang digunakan merupakan jenis bakteri pembentuk biofilm ringan, sedang, atau kuat. Penelitian ini hanya melihat secara kualitatif apakah bakteri dapat membentuk biofilm atau tidak, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengamati efek ekstrak mahkota bunga mawar dalam menghambat pembentukan biofilm yang ringan, sedang, atau kuat.