

Antibacterial Activity of Ethyl Acetate Fraction of *Centella asiatica* by Soxhletation Extraction Against *Pseudomonas aeruginosa*

Baiq Annisa Ulfi Anggraeni^{1*}, Neneng Rachmalia Izzatul Mukhlisah², Rosyunita³

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Indonesia;

²Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Indonesia;

³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Indonesia;

Article History

Received : November 03th, 2024

Revised : November 25th, 2024

Accepted : December 14th, 2024

*Corresponding Author:

Baiq Annisa Ulfi Anggraeni,
Program Studi Pendidikan
Dokter, Fakultas Kedokteran dan
Ilmu Kesehatan, Universitas
Mataram, Mataram, Indonesia;
Email: annisaulfi26@gmail.com

Abstract: Treatment of *P. aeruginosa* infection often involves antibiotics but these bacteria can develop resistance. An alternative strategy is developing drugs from natural ingredients such as gotu kola herb (*Centella asiatica*) which contains potential antibacterial secondary metabolites. This study aims to test the antibacterial activity of the ethyl acetate fraction of *C. asiatica* extracted by the soxhletation method against clinical isolates of *P. aeruginosa* and identify the secondary metabolites. The research used laboratory experiment using the disc diffusion method (Kirby-Bauer) in vitro. It includes 3 treatment groups with concentrations of 5.000 ppm, 7.500 ppm, and 10.000 ppm and 2 control groups: positive (colistin) and negative (DMSO 10%). The diameter of the inhibition zone served as an indicator of activity, and each group was reproduced five times. The biggest inhibitory zone diameter, with an average of 3 mm, was formed by the *C. asiatica* ethyl acetate fraction at a concentration of 7.500 ppm, according to the results. Secondary metabolites such triterpenoids, flavonoids, and phenolics were detected by phytochemical analyses. The ethyl acetate fraction of *C. asiatica* exhibited antibacterial activity against clinical isolate *P. aeruginosa*, as demonstrated by the significant difference between all concentration series with the positive control in the Mann-Whitney post-hoc test results.

Keywords: Antibacterial, *Centella asiatica*, ethyl acetate, soxhletation, *Pseudomonas aeruginosa*.

Pendahuluan

Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* merupakan masalah kesehatan global yang signifikan khususnya di rumah sakit sehingga menjadi penyebab infeksi nosokomial (Gellatly & Hancock, 2013; Spagnolo *et al.*, 2021). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram-negatif dengan kemampuan adaptasi yang tinggi serta kemampuan untuk menginfeksi berbagai organ tubuh sehingga dikategorikan sebagai patogen oportunistik yang sering kali menginfeksi individu dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah (Gellatly & Hancock, 2013; Horcajada *et al.*, 2019; Spagnolo *et al.*, 2021). *P.*

aeruginosa menjadi salah satu patogen yang bertanggung jawab sebesar 16% dari seluruh infeksi yang ditemukan di ICU (Saharman *et al.*, 2021).

Pengobatan infeksi *P. aeruginosa* dapat menggunakan antibiotik namun penggunaan antibiotik yang berkepanjangan dan tidak terkontrol dapat memicu bakteri ini untuk mengembangkan resistensi terhadap satu antibiotik dalam tiga atau lebih golongan antibiotik (*multidrug resistance*) (El Zowalaty *et al.*, 2015; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2022). Berdasarkan penelitian El Zowalaty *et al.* (2015), hanya sekitar 3.4% dari isolat *P. aeruginosa* yang

dilaporkan sensitif terhadap 9 agen antibakteri yang diuji (piperacilin, ticarcillin, meropenem, imipenem, amikasin, gentamisin, seftazidim, sefepim, dan siprofloksasin). Resistensi bakteri ini terhadap antibiotik dikenal sebagai *P. aeruginosa Multidrug Resistance* (MDR) yang dilaporkan kasusnya berkisar < 1-6% hingga setinggi 70% (El Zowalaty *et al.*, 2015).

Resistensi ini menjadi salah satu tantangan terbesar dalam pengobatan infeksi karena dikaitkan dengan peningkatan angka morbiditas dan mortalitas (Gellatly & Hancock, 2013; Tacconelli *et al.*, 2018; Spagnolo *et al.*, 2021). Oleh karena itu, salah satu strategi untuk mengatasi infeksi *P. aeruginosa* yaitu melalui pengembangan obat berbasis bahan alami aman dan efektif. Senyawa yang ditemukan pada tanaman, terutama jumlah molekul bioaktif, terkait dengan pemanfaatan bahan alami sebagai bentuk pengobatan. Tanaman memiliki produk metabolisme sekunder yang disebut zat bioaktif (Sutardi, 2016; Ogunka-Nnoka *et al.*, 2020). Salah satu bahan alami yang memiliki kandungan metabolit sekunder yaitu *Centella asiatica*. Penggunaan tradisional *C. asiatica* sebagai obat herbal untuk berbagai penyakit, termasuk infeksi, sudah ada sejak bertahun-tahun yang lalu (Idris & Nadzir, 2021; Bandopadhyay *et al.*, 2023).

Hasil penelitian Sutrisno *et al.*, (2014); Ferdous *et al.*, (2017); Sen *et al.*, (2019); Vinolina & Sigalingging, (2021); dan Siregar *et al.*, (2022) telah menunjukkan bahwa ekstrak dari *C. asiatica* mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, steroid, saponin, tanin, dan triterpenoid. Senyawa ini mempunyai aktivitas antibakteri terhadap beberapa jenis bakteri patogen termasuk *P. aeruginosa* (Sutrisno *et al.*, 2014). Senyawa fenolik dan triterpenoid menjadi metabolit sekunder terbanyak yang dimiliki oleh *C. asiatica* (Sen *et al.*, 2019). Berbagai senyawa aktif tersebut dapat diekstraksi menggunakan pelarut selektif melalui metode ekstraksi yang digunakan sehingga metode ekstraksi dan pelarut memiliki peran krusial dalam menentukan senyawa aktif yang diekstraksi dari bahan alami.

Sokletasi salah satu teknik ekstraksi yang dapat digunakan untuk mengekstrak zat kimia aktif dari *C. asiatica*. Sokhletasi memiliki kelebihan seperti hasil ekstraksi tidak meninggalkan residu sehingga memungkinkan

mengekstraksi *C. asiatica* lebih menyeluruh, sampel sering terkena pelarut sehingga memungkinkan mengekstraksi lebih banyak senyawa seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, glikosida, saponin, tanin, steroid, terpenoid, dan triterpenoid, serta proses ekstraksi lebih singkat dan menggunakan pelarut lebih sedikit dibandingkan dengan maserasi (Nasution *et al.*, 2018; Idris & Nadzir, 2021).

Fraksinasi diperlukan untuk memisahkan senyawa kimia kompleks dalam hasil ekstraksi berdasarkan tingkat polaritasnya. Fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih unggul dibandingkan ekstrak etanol, fraksi n-heksana, dan fraksi air. Hasil penelitian Sandy *et al.*, (2021), yang melakukan proses ekstraksi dengan maserasi dan kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi. Menurut penelitian dalam literatur, belum ada penelitian yang menilai aktivitas antibakteri fraksi etil asetat *C. asiatica* terhadap isolat klinis *P. aeruginosa* menggunakan metode ekstraksi sokhlet. Oleh karena itu, penting dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari *C. asiatica* dengan metode ekstraksi sokhletasi terhadap isolat klinis *P. aeruginosa*.

Bahan dan Metode

Jenis penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental laboratorium (*in vitro*) dengan rancangan penelitian *posttest-only control group design*. Subjek penelitian terdiri dari 3 kelompok perlakuan (fraksi etil asetat konsentrasi 5.000 ppm, 7.500 ppm, dan 10.000 ppm) serta 2 kelompok kontrol (kolistin sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif).

Alat dan Bahan

Alat penelitian yaitu timbangan elektrik analitik, *blender*, ayakan 40 mesh, *heating mantle*, apparatus sokhlet (labu alas bulat, tabung *thimble*, tabung sifon, pipa F, dan kondensor), pompa air, baskom, gunting, gelas ukur, *rotary vacuum evaporator*, kompor listrik, gelas beaker, cawan porselen, spatula, batang pengaduk, termometer, kompor listrik, kulkas, tabung Erlenmeyer, vortex, corong pisah, klem, statif, *laminar air flow*, gelas kimia, tabung reaksi, rak tabung, pipet ukur, pipet tetes, kaca objek, kawat ose, lampu spiritus, mikroskop, spuit,

mikropipet, *spreader*, cawan petri, pinset, inkubator, dan penggaris.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu simplisia *C. asiatica*, *silica gel*, kertas label, etanol 96%, kertas saring, es batu, *aluminium foil*, *plastic wrap*, tisu, sarung tangan, masker, aquades, n-Heksan, kloroform, etil asetat, reagen Dragendorff, reagen Mayer, reagen Wagner, FeCl₃, serbuk Mg 0.2 mg, HCl pekat, amil alkohol, H₂SO₄ pekat, gelatin, korek api, *stock culture* isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa*, kristal violet, lugol, safranin, minyak imersi, cakram antibiotik kolistin, media *MacConkey Agar* (MCA), media *Meuller-Hinton Agar* (MHA), tip mikropipet, DMSO 10%, larutan NaCl 0.9%, larutan standar McFarland 0,5 ml, dan cakram kosong (*blank disc*).

Ekstraksi *Centella asiatica*

Serbuk *C. asiatica* ditimbang sebanyak 300 gram dengan menggunakan timbangan elektrik analitik. Kertas saring dibuat menjadi selongsong yang dapat masuk ke tabung *thimble* dengan tinggi tidak melebihi tabung sifon. Serbuk *C. asiatica* dimasukkan ke dalam selongsong lalu kedua ujung selongsong diikat dengan irapat untuk mencegah serbuk keluar selama proses ekstraksi. Proses ekstraksi dimulai dengan menempatkan selongsong di dalam tabung *thimble* dan menambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:10 ke dalam labu alas bulat kemudian dipanaskan pada suhu 70°C hingga etanol 96% mendidih dan menguap. Uap pelarut yang dihasilkan akan naik melalui pipa F ke kondensor dan mengembun menjadi air yang kemudian jatuh ke tabung *thimble* yang berisi sampel *C. asiatica*.

Proses ekstraksi sokhletasi melibatkan pengulangan siklus ekstraksi yang meliputi pemanasan dan pendinginan hingga senyawa aktif dari *C. asiatica* larut dalam etanol 96%. Ekstrak diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C dan kompor listrik untuk memekatkan ekstrak sehingga etanolnya habis dan diperoleh ekstrak kental etanol *C. asiatica*. Selanjutnya, ekstrak kental yang diperoleh dari proses ekstraksi ditimbang untuk mengetahui persen rendemennya lalu dimasukkan dalam wadah tertutup untuk menjaga kualitas dan stabilitas ekstrak. Semakin besar persen rendemen maka semakin banyak

kandungan senyawa yang terekstraksi dari sampel *C. asiatica*.

Fraksinasi Ekstrak Etanol *Centella asiatica*

350 mililiter air hangat (40°C) digunakan untuk melarutkan ekstrak kental 35 gram hingga larut sempurna. Dengan menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan etil asetat, fraksinasi dilakukan sebanyak tiga kali. Pertama, pelarut n-heksana digunakan sebanyak tiga kali dalam corong pisah untuk melakukan fraksinasi. Fraksinasi yang pertama menggunakan 350 ml n-heksan kemudian 2 kali dengan 175 ml n-heksan. Kedua, fraksi air yang didapatkan dari fraksinasi n-heksan dilanjutkan fraksinasi dengan pelarut kloroform sebanyak 3 kali dengan cara yang sama seperti fraksinasi sebelumnya. Ketiga, dengan menggunakan teknik yang sama, fraksi air dipisahkan tiga kali lagi menggunakan pelarut etil asetat. *Rotary vacuum evaporator* digunakan untuk menguapkan fraksi etil asetat yang dihasilkan pada suhu 40°C, dan sebuah hot plate digunakan untuk mengonsentrasikannya hingga fraksi yang kental tercapai.

Uji Fitokimia

Uji alkaloid

Alkaloid diuji menggunakan tiga reagen yaitu Dragendorff, Mayer, dan Wagner. Tiga tabung reaksi yang berisi 3 mililiter fraksi etil asetat *C. asiatica* dan 3 mililiter HCL 2N dimasak di atas hot plate selama 2menit (Meigaria *et al.*, 2016; Indah *et al.*, 2022). Menambahkan 4 tetes reagen Dragendorff dalam tabung reaksi pertama; jika terbentuk endapan merah atau jingga, uji alkaloid positif (Abubakar & Haque, 2020). Menambahkan empat tetes reagen Mayer dalam tabung reaksi kedua; jika terbentuk endapan putih atau kuning keruh, uji alkaloid positif (Indah *et al.*, 2022; Julianto, 2019). Empat tetes reagen Wagner diteteskan ke tabung reaksi ketiga; jika terbentuk endapan coklat kemerahan, uji alkaloid positif (Abubakar & Haque, 2020).

Uji Fenolik

Fenolik diuji menggunakan reagen FeCl₃. Memasukkan sebanyak 3 ml fraksi etil asetat *C. asiatica* dalam tabung reaksi lalu menambahkan beberapa tetes larutan FeCl₃. Endapan berwarna hijau pekat atau perubahan warna menjadi hitam

kebiruan menunjukkan hasil positif fenolik (Julianto, 2019; Zambari *et al.*, 2023).

Uji Flavonoid

Flavonoid diuji menggunakan tes *wilstater*. Sebanyak 0,2 g serbuk magnesium, 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amil alkohol ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 3 ml fraksi etil asetat *C. asiatica* (Julianto, 2019; Sudira *et al.*, 2019). Lapisan amil alkohol berubah menjadi kuning, menandakan hasil yang berhasil (Sudira *et al.*, 2019).

Uji saponin

3 mililiter fraksi etil asetat *C. asiatica* dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diaduk kuat selama sepuluh detik secara vertikal untuk menguji saponin. Hasil positif saponin jika terbentuk busa stabil selama 10 menit hingga 1–10 cm. Selanjutnya, larutan HCl 2N ditambahkan sebanyak 2 tetes untuk menstabilkan busa, hasil positif saponin jika busa tidak hilang (Sulasmi *et al.*, 2018; Indah *et al.*, 2022).

Uji Steroid dan Triterpenoid

Steroid dan triterpenoid diuji menggunakan kloroform dan H₂SO₄ pekat. 3 mililiter fraksi etil asetat *C. asiatica* dicampur dalam tabung reaksi, diikuti dengan penambahan masing-masing satu mililiter kloroform dan H₂SO₄. Perubahan warna menjadi merah atau jingga kemerahan menunjukkan hasil positif triterpenoid, sedangkan warna hijau kebiruan menunjukkan hasil positif steroid (Sulasmi *et al.*, 2018).

Uji Tanin

Gelatin digunakan untuk mengevaluasi tanin. Lima tetes larutan gelatin ditambahkan ke tabung reaksi yang berisi tiga mililiter fraksi etil asetat *C. asiatica*. Pembentukan endapan putih menandakan hasil tanin yang baik (Pandey & Tripathi, 2014; Mera *et al.*, 2019).

Uji aktivitas antibakteri

Penelitian ini menggunakan uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram (*Kirby-Bauer*). Kertas cakram direndamkan pada masing-masing konsentrasi fraksi etil asetat *C. asiatica* dan kontrol negatif menggunakan larutan DMSO 10%. Selanjutnya, inokulasi 100 µl suspensi isolat klinis *P. aeruginosa* pada media MHA

menggunakan mikropipet lalu diratakan dengan *spreader*. Pinset digunakan untuk meletakkan kertas cakram yang telah direndam, dengan jarak setiap cakram sekitar 2-3 cm, pada permukaan media MHA. Kontrol kolistin positif sama saja. Selain itu, proses inkubasi dilakukan dalam inkubator yang diatur pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, diameter zona hambat pertumbuhan bakteri diukur dengan penggaris berskala milimeter (mm) pada area bening di sekitar kertas cakram untuk mengetahui besarnya daya hambat fraksi etil asetat *C. asiatica* terhadap isolat klinis *P. aeruginosa*. Setiap kelompok dilakukan pengujian sebanyak 5 kali replikasi.

Analisis Data

Data zona hambat fraksi etil asetat *Centlla asiatica* dianalisis dengan uji normalitas *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel kecil yaitu <50 sampel data serta uji homogenitas menggunakan *Levene's Test* (Tyastirin & Hidayati, 2017). Apabila data terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan uji parametrik dengan uji *one-way ANOVA*. Jika data terdistribusi tidak normal, maka uji *one-way ANOVA* tidak bisa dilakukan sehingga menggunakan uji nonparametrik yaitu *Kruskal-Wallis* dengan jumlah kelompok sampel lebih dari dua. Apabila uji *one-way ANOVA* atau uji *Kruskal-Wallis* didapatkan hasil yang bermakna yaitu $p < 0.05$, maka dilanjutkan uji *Post Hoc* dengan Mann-Whitney untuk membandingkan dua kelompok antara satu kelompok dengan kelompok lainnya sehingga mengetahui adakah perbedaan yang signifikan. Analisis data tersebut menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) edisi 25.

Hasil dan Pembahasan

Hasil ekstraksi dan fraksinasi


Filtrat yang didapatkan dari ekstraksi *C. asiatica* menggunakan metode sokhletasi menghasilkan 51,86 gram ekstrak kental etanol berwarna cokelat tua dengan persentase rendemen sebesar 17,28%. Sementara itu, hasil fraksinasi *C. asiatica* menggunakan metode corong pisah menghasilkan 0,916 gram fraksi etil asetat dengan persentase rendemen sebesar 2,61%.

Hasil Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa fraksi etil asetat *C. asiatica* mengandung

metabolit sekunder yaitu fenolik, flavonoid, dan triterpenoid yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Fotokimia Fraksi Etil Asetat *Centella asiatica*

Uji	Reagen	Parameter Hasil Positif	Hasil	Foto Tabung
Alkaloid	Dragendroff Mayer	Endapan merah atau jingga	-	
	Wagner	Endapan putih atau kuning keruh	-	
	Wagner	Endapan coklat/kemerahan	-	
Fenolik	FeCl ₃	Endapan hijau pekat	+	
Flavonoid	HCl pekat, serbuk Mg, amil alkohol	Perubahan warna kuning	+	
Saponin	HCl 2N	Terbentuknya busa	-	
Steroid/ Triterpenoid	Kloroform, H ₂ SO ₄	Perubahan warna menjadi hijau kebiruan untuk steroid dan perubahan warna menjadi merah atau jingga kecoklatan untuk triterpenoid	+(Triterpenoid)	
Tanin	Gelatin	Endapan putih	-	

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Metode difusi cakram (Kirby-Bauer) digunakan untuk menyelidiki aktivitas antibakteri dan menentukan seberapa baik penghambatan bakteri bekerja. Pembentukan zona bening di sekitar kertas cakram

menunjukkan daya penghambatan fraksi etil asetat *C. asiatica* terhadap isolat klinis *P. aeruginosa* pada dosis 5.000 ppm, 7.500 ppm, dan 10.000 ppm. Tabel 2 menunjukkan diameter zona penghambatan yang dihasilkan dari uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat *C. asiatica*.

Tabel 2. Respons Zona Hambat Fraksi Etil Asetat *Centella asiatica*

Kelompok	Rata-Rata Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori Respons Hambat
Konsentrasi 5.000 ppm	1,96 ± 1,89	Lemah
Konsentrasi 7.500 ppm	3 ± 1,41	Lemah
Konsentrasi 10.000 ppm	2,96 ± 1,49	Lemah
Kontrol positif	7,3 ± 0,00	Sedang
Kontrol negatif	0 ± 0,00	Tidak ada aktivitas

Pembahasan

Ekstraksi dan Fraksinasi *Centella asiatica*

Saringan 40 mesh digunakan untuk meningkatkan luas permukaan simplisia *C. asiatica* setelah digiling dalam blender. Hal ini meningkatkan kontak antara simplisia dan pelarut selama ekstraksi dan memfasilitasi kemampuan pelarut untuk menarik metabolit sekunder dari simplisia (Amaliah *et al.*, 2019). Etanol 96%, pelarut ekstraksi, dapat membahayakan sel tanaman pada konsentrasi tinggi, membuatnya lebih mudah melewati dinding sel *C. asiatica* dan menarik senyawa sekunder polar (Pandey & Tripathi, 2014; Idris & Nadzir, 2021; Wendersteyt *et al.*, 2021; Masriani *et al.*, 2023). *C. asiatica* diekstraksi menggunakan metode sokhletasi. Sokletasi adalah teknik untuk mengekstraksi lebih banyak bahan kimia yang tahan panas dari sampel dengan lebih cepat dan dengan lebih sedikit pelarut daripada maserasi. Teknik ini melibatkan pemanasan sampel dan penyaringan berulang kali untuk memaparkannya pada pelarut (Nasution *et al.*, 2018; Idris & Nadzir, 2021). Selain itu, metode sokhletasi tidak meninggalkan residu sehingga memungkinkan *C. asiatica* terekstraksi secara menyeluruh.

Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia tahun 2017, hasil rendemen yang baik pada ekstrak kental herba pegagan yaitu lebih dari 7,3% (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Nilai rendemen berkaitan dengan banyaknya metabolit sekunder yang terekstrak dari simplisia *C. asiatica* yang digunakan. Semakin banyak metabolit sekunder yang diisolasi dari sampel *C. asiatica*, semakin tinggi persentase hasil. Terdapat beberapa hal yang dapat memengaruhi hasil rendemen termasuk waktu ekstraksi, suhu, rasio pelarut dengan sampel, jumlah pengulangan ekstraksi sampel, dan jenis pelarut (Khoddami *et al.*, 2013).

Fraksinasi diperlukan untuk memisahkan bahan kimia kompleks dalam hasil ekstraksi

menurut tingkat polaritasnya. Dalam penelitian ini, tiga pelarut n-heksana, kloroform, dan etil asetat difraksinasi secara berurutan menggunakan metode corong pisah. Berdasarkan prinsip "like dissolves like", senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa yang bersifat nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar karena adanya perbedaan tingkat polaritas dalam pelarut (Haslina & Eva, 2017). Zat polar, semipolar, dan nonpolar dapat diekstraksi menggunakan etil asetat sebagai pelarut karena sifatnya yang semipolar (Murdiyansah *et al.*, 2020). Pelarut ini memiliki kemampuan untuk bercampur dengan eter, etanol, dan kloroform sehingga menjadikannya pilihan pelarut yang efektif (Maneak, 2018).

Uji Fitokimia Fraksi Etil Asetat *Centella asiatica*

Uji fitokimia dilakukan dengan pengujian kualitatif menggunakan metode uji tabung. Metode ini melibatkan observasi perubahan yang terjadi setelah penambahan reagen sehingga dapat mengidentifikasi metabolit sekunder dalam fraksi etil asetat *C. asiatica*. Tabel 2 menampilkan hasil identifikasi dan mengungkapkan keberadaan metabolit sekunder, termasuk triterpenoid, flavonoid, dan fenolik. Ketiga metabolit sekunder tersebut memiliki cara kerja yang sama seperti kolistin yang dapat melarutkan dinding sel bakteri (Thi Khanh Nhu *et al.*, 2016). Selain itu, ketiga metabolit sekunder tersebut memiliki sifat termostabil karena memiliki titik didih yakni 181,7°C (Nurfadilah *et al.*, 2021). Oleh karena itu, metode ekstraksi cara panas seperti sokhletasi yang menggunakan suhu 70°C dapat mengekstraksi senyawa yang tidak terdegradasi oleh pemanasan seperti fenolik, flavonoid, dan triterpenoid. Sementara itu, alkaloid, saponin, dan steroid memiliki sifat termolabil atau tidak tahan dengan pemanasan sehingga ekstraksi cara dingin akan lebih baik digunakan untuk mengekstraksi

metabolit sekunder tersebut (Nurfadilah *et al.*, 2021).

Fenolik dapat berkontribusi pada penghambatan pertumbuhan bakteri dengan mendenaturasi protein sel dan mencegah produksi asam nukleat bakteri (Rahmadeni *et al.*, 2019; Widowati *et al.*, 2021). Adanya kandungan fenolik ditandai dengan terbentuknya endapan hijau pekat saat direaksikan dengan beberapa tetes ferri klorida (FeCl_3). Flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan berinteraksi langsung dengan membran sel bakteri karena memiliki sifat lipofilik yang dapat menyebabkan kerusakan pada struktur membran (Renzetti *et al.*, 2020). Selain itu, flavonoid juga dapat menghambat pembentukan biofilm dan menghambat sintesis asam nukleat dengan menghambat DNA gyrase (Lobiuc *et al.*, 2023). Kandungan flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna kuning setelah direaksikan dengan 1 ml HCl pekat, 0,2 mg serbuk Mg, dan 1 ml amil alkohol yang disebabkan oleh reaksi reduksi oleh HCl pekat dan serbuk Mg.

Triterpenoid juga bekerja untuk menghentikan pertumbuhan bakteri dengan menyebabkan kerusakan pada membran sel bakteri, yang menyebabkan kebocoran sitoplasma dan kematian sel (Subaryanti *et al.*, 2022). Selain itu, triterpenoid menunjukkan aktivitas antibakteri melalui penghambatan sintesis protein dan mengganggu membran sitoplasma (Widowati *et al.*, 2021). Adanya kandungan triterpenoid ditandai dengan perubahan warna merah saat direaksikan dengan 1 ml kloroform dan 1 ml H_2SO_4 .

Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat *Centella asiatica*

Sebuah bahan alami memiliki potensi sebagai antibakteri karena di dalamnya terkandung berbagai metabolit sekunder (Sutardi, 2016; Mahmood *et al.*, 2019). Sifat antibakteri zat alami ini terbagi dalam beberapa area. Menurut klasifikasi Davis & Stout (1971) dalam Novita (2017) bahwa diameter zona penghambatan yang terbagi dalam empat kelompok menunjukkan aktivitas antibakteri zat alami yakni diameter > 20 mm (sangat kuat), diameter 10-20 mm (kuat), diameter 5-9 (sedang), dan diameter < 5 (lemah).

Tabel 2 menunjukkan fraksi etil asetat *C. asiatica* didapatkan aktivitas antibakteri minimal

terhadap isolat klinis *P. aeruginosa*. Hal ini mungkin terjadi karena konsentrasi metabolit sekunder fraksi etil asetat, yang memberikan aktivitas antibiotik pada *C. asiatica*, tidak mencukupi. Fraksi etil asetat *C. asiatica* menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, menurut sebuah penelitian oleh Sandy *et al.* (2021), dengan diameter zona penghambatan rata-rata 13,66 mm pada konsentrasi 20%. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian tersebut. Penggunaan isolat klinis bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari spesimen pasien (sputum) yang bersifat patogen dalam penelitian ini mungkin menjadi penyebab perbedaan hasil. Bakteri yang berasal dari isolat klinis cukup persisten untuk memproduksi alginat yang berkontribusi terhadap pembentukan dan pengembangan matriks biofilm (Moradali & Rehm, 2019). Hal ini meningkatkan resistensi bakteri yang berasal dari isolat klinis terhadap agen antibakteri dan pertahanan tubuh inang.

Pseudomonas aeruginosa termasuk dalam klasifikasi bakteri Gram-negatif dengan dinding sel yang mengandung komponen membran luar yang merupakan struktur bilayer asimetris dengan kandungan lipid yang tinggi (Riedel *et al.*, 2019; Paray *et al.*, 2023). Struktur tersebut menjadi penghalang selektif yang membuat bakteri tersebut memiliki permeabilitas yang rendah. Hal ini menyebabkan lambatnya molekul antibakteri yang besar dalam menembus membran luar (Riedel *et al.*, 2019). Oleh karena itu, resistensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* relatif tinggi pada beberapa agen antibakteri karena permeabilitas membran luarnya 100 kali lebih rendah daripada *Escherichia coli* (Riedel *et al.*, 2019).

Membran luar *P. aeruginosa* juga terdapat komponen lipopolisakarida (LPS) yang memiliki peran dalam antigenisitas, respons inflamasi, dan mencegah masuknya molekul eksternal (Gellatly & Hancock, 2013). LPS terdiri dari lipid A, inti oligosakarida, dan antigen O (Zhang *et al.*, 2018). Bakteri dari isolat klinis dapat melakukan modifikasi lipid A yang menyebabkan resistensi bakteri terhadap polimiksin dan peptida antimikroba kationik seperti kolistin serta mengubah sifat inflamasinya (Gellatly & Hancock, 2013). Lipid A dan antigen O merupakan komponen yang paling berkontribusi

terhadap infeksi sehingga LPS menjadi salah satu faktor virulensi utama bakteri *P. aeruginosa*.

Faktor virulensi lainnya yang disekresikan oleh *P. aeruginosa* dan dapat berkontribusi pada patogenisitasnya yaitu eksotoksin A, lipase, fosfolipase, piosianin, dan rhamnolipid (Bjarnsholt, 2013; Gellatly & Hancock, 2013). Eksotoksin A menghambat *elongation factor 2* (EF2) inang sehingga menghambat sintesis protein dan menginduksi apoptosis sel inang (Gellatly & Hancock, 2013). Adanya eksotoksin A pada bakteri dapat meningkatkan virulensi 20 kali lipat dibandingkan dengan bakteri yang defisiensi eksotoksin A (Gellatly & Hancock, 2013). Lipase dan fosfolipase memecah lipid dan fosfolipid membran sel inang. Piosianin (pigmen hijau kebiruan) memberi warna pada koloni *P. aeruginosa* dan dapat menyebabkan stres oksidatif pada inang, mengganggu katalase inang dan transpor elektron mitokondria, menginduksi apoptosis pada neutrofil, serta menghambat fagositosis sel tubuh yang apoptosis oleh makrofag (Gellatly & Hancock, 2013). Produksi rhamnolipid dalam biofilm *P. aeruginosa* bersifat protektif sehingga tidak mudah dihancurkan oleh leukosit polimorfonuklear (PMN) (Bjarnsholt, 2013). Isolat klinis *P. aeruginosa* memiliki kapasitas untuk menghasilkan rhamnolipid selama beberapa dekade dalam infeksi kronis (Bjarnsholt, 2013).

Ketika konsentrasi fraksi etil asetat *C. asiatica* ditingkatkan, efektivitas antibakteri dapat berubah namun peningkatan konsentrasi tidak selalu berarti terjadi peningkatan efek antibakteri. Fraksi etil asetat *C. asiatica* pada 5.000 ppm menghasilkan diameter zona penghambatan rata-rata terpendek, sedangkan pada 7.500 ppm menghasilkan diameter zona penghambatan rata-rata terbesar, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi ideal untuk menghentikan pertumbuhan isolat klinis *P. aeruginosa* adalah 7.500 ppm. Perbedaan yang dihasilkan dalam zona hambat dapat dipengaruhi oleh faktor perbedaan sensitivitas organisme yang dihambat serta mekanisme kerja dan interaksi antara metabolit sekunder yang terkandung pada sampel yang diuji (Haryati *et al.*, 2016). Faktor lain yang dapat memengaruhi kualitas daya hambat yaitu peningkatan konsentrasi yang dapat membuat larutan fraksi menjadi lebih kental sehingga metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya

tidak tercampur rata ketika fraksi dilarutkan (Dianah *et al.*, 2020). Hal ini dapat memengaruhi kecepatan dan kemampuan difusi metabolit sekunder yang memiliki peran antibakteri ke dalam media agar sehingga dapat menyebabkan terjadinya perbedaan diameter zona hambat (Anggita *et al.*, 2018). Dengan demikian, peningkatan konsentrasi tidak selalu berbanding lurus dengan efek antibakterinya yang dapat diamati dari diameter zona hambat yang terbentuk.

Tabel 3. Hasil Uji *Post Hoc* dengan Mann-Whitney

Perbandingan Dua Kelompok Sampel	
5.000 ppm	7.500 ppm* 10.000 ppm* Kontrol Positif** Kontrol Negatif*
7.500 ppm	10.000 ppm* Kontrol Positif** Kontrol Negatif**
10.000 ppm	Kontrol Positif** Kontrol Negatif**

Ket : *) = tidak berbeda signifikan; **) = berbeda signifikan

Shapiro Wilk digunakan untuk menguji normalitas, dan Uji Levene digunakan untuk menguji homogenitas. Hasilnya menunjukkan beberapa data tidak terdistribusi normal dan bervariasi secara tidak homogen. Kelompok perlakuan fraksi etil asetat *C. asiatica*, yang mencakup konsentrasi 5.000 ppm, 7.500 ppm, dan 10.000 ppm, juga menunjukkan perbedaan yang signifikan (nilai $p < 0,05$) dalam menghambat pertumbuhan isolat klinis *P. aeruginosa* jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kontrol negatif, menurut hasil uji Kruskal-Wallis. Perbedaan ini menunjukkan bahwa diameter zona penghambatan yang dihasilkan secara signifikan dipengaruhi oleh konsentrasi komponen etil asetat *C. asiatica*.

Hasil uji *Post Hoc* menggunakan Mann-Whitney menunjukkan adanya perbedaan signifikan (p value $< 0,05$) antara semua seri konsentrasi dengan kontrol positif dalam menghambat isolat klinis *P. aeruginosa* yang menunjukkan semua seri konsentrasi fraksi etil asetat *C. asiatica* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap isolat klinis *P. aeruginosa* namun konsentrasi 5.000 ppm dengan kontrol negatif menunjukkan tidak ada perbedaan yang

signifikan (p value > 0,05) artinya konsentrasi 5.000 ppm memiliki efek yang sama dengan kontrol negatif dalam menghambat pertumbuhan isolat klinis *P. aeruginosa*. Dengan demikian, konsentrasi 7.500 ppm dan 10.000 ppm yang efektif dalam menghambat pertumbuhan isolat klinis *P. aeruginosa*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, fraksi etil asetat *Centella asiatica* menggunakan metode ekstraksi sokhletasi memiliki aktivitas antibakteri terhadap isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa*. Konsentrasi optimum untuk menghambat pertumbuhan isolat klinis *P. aeruginosa* yakni 7.500 ppm yang membentuk diameter zona hambat dengan rata-rata 3 mm. Hal ini disebabkan oleh kandungan metabolit sekunder pada fraksi etil asetat *C. asiatica* seperti fenolik, flavonoid, dan triterpenoid yang dapat berperan sebagai antibakteri.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti ucapkan terima kasih kepada Universitas Mataram atas dukungan pendanaan dalam penelitian ini. Selain itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Mataram atas bantuan berupa fasilitas, kerja sama, serta kontribusi moral dan material yang telah diberikan selama pelaksanaan penelitian ini.

Referensi

- Abubakar, A. R. & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 12 (1): 1–10. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
- Amaliah, A., Sobari, E. & Mukminah, N. (2019). Rendemen dan Karakteristik Fisik Ekstrak Oleoresin Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dengan Pelarut Heksan. *10th Industrial Research Workshop and National Seminar, Jul. 24-25, Politeknik Negeri Bandung, Bandung*, pp: 273–278. doi: 10.35313/irwns.v10i1.1399.
- Bandopadhyay, S., Mandal, S., Ghorai, M., Jha, N. K., Kumar, M., Radha, Ghosh, A., Proćków, J., Pérez de la Lastra, J. M. & Dey, A. (2023). Therapeutic properties and pharmacological activities of asiaticoside and madecassoside: A review. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 27 (5): 593–608. doi: 10.1111/jcmm.17635.
- Bjarnsholt, T. (2013). The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infections. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 121 (Suppl. 136): 1–54. doi: 10.1111/apm.12099.
- El Zowalaty, M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K., Marei, H. E. & Ashour, H. M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*, 10 (10): 1683–1706. doi: 10.2217/fmb.15.48.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2022). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2020 data. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Joint-WHO-ECDC-AMR-report-2022.pdf> (Accessed on November 18, 2024)
- Ferdous, N., Rahman, M. & Alamgir, A. (2017). Investigation on phytochemical, cytotoxic and antimicrobial properties of ethanolic extracts of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5 (2): 187–188. <https://www.plantsjournal.com/archives/2017/vol5issue2/PartC/5-2-12-966.pdf> (Accessed on November 18, 2024)
- Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67 (3): 159–173. doi: 10.1111/2049-632X.12033.
- Haryati, N. A., Saleh, C. & Erwin. (2016). Uji Toksisitas dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Merah Tanaman Pucuk Merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 13 (1): 35-40.

- <https://core.ac.uk/download/267828964.pdf> (Accessed on November 18, 2024)
- Haslina & Eva, M. (2017). Extract Corn Silk with Variation of Solvents on Yield, Total Phenolics, Total Flavonoids and Antioxidant Activity. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, 14 (1): 21–28. <https://journal.ugm.ac.id/ifnp/article/view/File/24280/16079> (Accessed on November 16, 2024)
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N. & Grau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 32 (4): 1–52. doi: 10.1128/CMR.00031-19.
- 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*. 10 (4): 457. doi: 10.3390/antibiotics10040457.
- 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. doi: 10.20956/mff.v26i2.19903.
- Julianto, T. S. (2019). Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia. 1st Ed. Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta. ISBN: 978-602-450-332-1, pp: 85, 88.
- Kementerian Kesehatan RI. (2017). Farmakope Herbal Indonesia. Edisi II. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta. <https://bikinpabrik.id/wp-content/uploads/2023/04/Farmakope-Herbal-Indonesia-Edisi-II-Tahun-2017-1.pdf>.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A. & Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18 (2): 2328–2375. doi: 10.3390/molecules18022328.
- Lobiuc, A., Pavál, N., Mangalagiu, I. I., Gheorghit, ă, R., Teliban, G., Amăriucăi-Mantu, D. & Stoleru, V. (2023). Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules*, 28 (3): 1114. doi: 10.3390/molecules28031114.
- Mahmood, N., Nazir, R., Khan, M., Khaliq, A., Adnan, M., Ullah, M. & Yang, H. (2019). Antibacterial Activities, Phytochemical Screening and Metal Analysis of Medicinal Plants: Traditional Recipes Used against Diarrhea. *Antibiotics*, 8 (4): 194. doi: 10.3390/antibiotics8040194.
- Maneak, I. E. (2018). *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi n-Heksana, Etil Asetat, serta Air dari Daun Jambu Air (Syzygium aqueum) terhadap Pertumbuhan Escherichia coli ATCC 25922*. Program Studi Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta, Indonesia.
- Masriani, Muharini, R., Wijayanti, D. K., Melania, P. & Sari, M. L. W. (2023). Phytochemical Screening of Ethanol Extracts from Three Variants of Kratom Leaves (*Mitragyna speciosa* Korth.). *Hydrogen: Jurnal Kependidikan Kimia*, 11 (2): 192–201. doi: 10.33394/hjkk.v11i2.7122.
- Mera, I. F. G., Falconí, D. E. G., & Córdova, V. M. (2019). Secondary metabolites in plants: main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. *Revista Bionatura*, 4 (4): 1000-1009. doi: 10.21931/RB/2019.04.04.11.
- Moradali, M.F. & Rehm, B.H.A. (2019). The Role of Alginate in Bacterial Biofilm Formation. In: *Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices*, Springer Nature Switzerland, pp: 517–537. doi: 10.1007/978-3-030-12919-4_13.
- Murdiyansah, S., Rasmi, D. A. C. & Mertha, I. G. (2020). *Centella asiatica* Activities towards *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Growth. *Jurnal Biologi Tropis*, 20 (3): 499–506. doi: 10.29303/jbt.v20i3.1418.
- Nasution, Mhd. Y., Restuati, M., Pulungan, A. S. S., Pratiwi, N., & Diningrat, D. S. (2018). Antimicrobial Activities of *Centella asiatica* Leaf and Root Extracts on Selected Pathogenic Micro-organisms.

- Journal of Medical Sciences*, 18 (4): 198–204. doi: 10.3923/jms.2018.198.204.
- Novita, W. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Daun Sirih (*Piper Betle L*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* secara In Vitro. *Jambi Medical Journal: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*, 4 (2): 140–155. doi: 10.22437/jmj.v4i2.3579.
- Octora, M., Permatasari, L., Hasbi, N., Sunarwidhi, A. L. & Dirja, B.T. (2022). *Centella asiatica* Extract as Antibacterial Agent against Multidrug Resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa*. *Azerbaijan Medical Journal*, 62 (9): 5007-5015. <https://www.azerbaijanmedicaljournal.net/volume/AMJ/62/09/centella-asiatica-extract-as-antibacterial-agent-against-multidrug-resistant-mdr-pseudomonas-aeruginosa-6382f85d10fa6.pdf> (Accessed on November 16, 2024)
- Ogunka-Nnoka, C. U., Igwe, F. U., Agwu, J., Peter, O. J. & Wolugbom, P. H. (2020). Nutrient and Phytochemical Composition of *Centella asiatica* Leaves. *Medicinal & Aromatic Plants*, 9 (2): 346. doi: 10.35248/2167-0412.20.9.346.
- Pandey, A. & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2 (5): 115–119. <https://www.phytojournal.com/archives/2014/vol2issue5/PartB/11.1.pdf> (Accessed on November 11, 2024)
- Paray, A. A., Singh, M., Mir, M. A. & Kaur, A. (2023). Gram Staining: A Brief Review. *International Journal of Research and Review*, 10 (9): 336–341. doi: 10.52403/ijrr.20230934.
- Rahmadeni, Y., Febria, F. A. & Bakhtiar, A. (2019). Potensi Pakih Sipasan (*Blechnum orientale*) sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Sciences*, 6 (2): 224–229. doi: 10.24843/metamorfosa.v06.i02.p12.
- Renzetti, A., Betts, J. W., Fukumoto, K. & Rutherford, R. N. (2020). Antibacterial green tea catechins from a molecular perspective: mechanisms of action and structure–activity relationships. *Food & Function*, 11 (11): 9370–9396. doi: 10.1039/D0FO02054K.
- Riedel, S., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., Sakanari, J. A., Hotez, P. & Mejia, R. (2019). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 28th Ed. McGraw-Hill Education, New York. ISBN: 978-1-26-001203-3, pp: 26-27.
- Saharman, Y. R., Karuniawati, A., Severin, J. A. & Verburch, H. A. (2021). Infections and antimicrobial resistance in intensive care units in lower-middle income countries: a scoping review. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 10: 22. doi: 10.1186/s13756-020-00871-x.
- Sandy, M., Wardani, T. S. & Septiarini, A. D. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak, Fraksi N-Heksan, Fraksi Etil Asetat, Fraksi Air Daun Pengagan (*Centella asiatica (L.) Urb*) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. *Media Farmasi Indonesia*, 16 (2): 1683–1692. doi: 10.53359/mfi.v16i2.184.
- Sen, K. K., Chouhan, K. B. S., Tandey, R., Mehta, R. & Mandal, V. (2019). Impact of microwaves on the extraction yield of phenolics, flavonoids, and triterpenoids from centella leaves: An approach toward digitized robust botanical extraction. *Pharmacognosy Magazine*, 15 (64): 267–273. doi: 10.4103/pm.pm_99_19.
- Siregar, A., Mutia, M. S. & Napiah, A. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica (L.) Urb*) pada Bakteri *Staphylococcus aureus*. *PHARMASIPHA: Pharmaceutical Journal of Islamic Pharmacy*, 6 (1): 21–28. doi: 10.21111/pharmasipha.v5i1.
- Spagnolo, A. M., Sartini, M. & Cristina, M. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Reviews in Medical Microbiology*, 32 (3): 169–175. doi: 10.1097/MRM.0000000000000271.
- Subaryanti, Meianti, D. S. D. & Manalu, R. T. (2022). Potensi Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Urticastrum decumanum (Roxb.) Kuntze*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. *Sainstech Farma Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 15 (2): 93–102.
- Sudira, I. W., Merdana, I. M., & Qurani, S. N. (2019). Preliminary Phitochemical

- Analysis of Guava Leaves (*Psidium guajava* L.) as Antidiarrheal in Calves. *Advances in Tropical Biodiversity and Environmental Sciences*, 3 (2): 21–24. doi: 10.24843/atbes.v03.i02.p01.
- Sulasmi, E. S., Wuriانا, Z. F., Sari, M. S. & Suhadi (2018). Analisis Kualitatif Kandungan Senyawa Aktif (Flavonoid, Alkaloid, Polifenol, Saponin, Terpenoid dan Tanin) pada Ekstrak Metanol Daun dan *Rhizoma Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching di Taman Nasional Baluran. *Prosiding Seminar Nasional VI Hayati 2018, Sep. 22, Malang*, pp: 121–128. doi: 10.29407/hayati.v6i1.655.
- Sutrisno, E., Adnyana, I. K., Sukandar, E. Y., Fidrianny, I. & Lestari, T. (2014). Kajian Aktivitas Penyembuhan Luka dan Antibakteri Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis, Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) serta Kombinasinya terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dari Pasien Luka Kaki Diabetes. *Bionatura- Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati dan Fisik*, 16 (2): 78–82. <https://jurnal.unpad.ac.id/bionatura/article/view/7567> (Accessed on November 18, 2024)
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Oueltte, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U., Magrini, N., & WHO Pathogens Priority List Working Group†. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18 (3): 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- Thi Khanh Nhu, N., Riordan, D. W., Do Hoang Nhu, T., Pham Thanh, D., Thwaites, G., Phu Huong Lan, N., Wren, B. W., Baker, S. & Stabler, R. A. (2016). The induction and identification of novel Colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. *Scientific Reports*, 6 (1): 28291. doi: 10.1038/srep28291.
- Vinolina, N. S. & Sigalingging, R. (2021). Phytochemical screening and biomass production of *Centella asiatica* (L.) Urb of Samosir - Indonesia accession cultivated on acid soil with different phosphorus treatments. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing Ltd, pp: 1–7. doi: 10.1088/1755-1315/782/3/032021.
- Wendersteyt, N. V., Wewengkang, D. S. & Abdullah, S. S. (2021). Uji Aktivitas Antimikroba dari Ekstrak dan Fraksi *Ascidian Herdmania momus* dari Perairan Pulau Bangka Likupang terhadap Pertumbuhan Mikroba *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *Candida albicans*. *Pharmakon*, 10 (1): 706–712. doi: 10.35799/pha.10.2021.32758.
- Widowati, R., Handayani, S. & Al Fikri, A. R. (2021). Phytochemical Screening and Antibacterial Activities of Senggani (*Melastoma malabathricum* L.) Ethanolic Extract Leaves. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*, 26 (4): 562–568. doi: 10.18343/jipi.26.4.562.
- Zambari, I. F., Muhamad, N. A. & Hafid, S. R. A. (2023). A Comparative Study of Anti-Inflammatory Properties and Activities of Green and Red *Christia vespertilionis* Leaves. *Sains Malaysiana*, 52 (1): 211–222. doi: 10.17576/jsm-2023-5201-17.
- Zhang, R., Ji, J., Blaženović, I., Pi, F., Wang, T., Zhang, Y. & Sun, X. (2018). Investigation into Cellular Glycolysis for the Mechanism Study of Energy Metabolism Disorder Triggered by Lipopolysaccharide. *Toxins*, 10 (11): 441. doi: 10.3390/toxins10110441