

Daya Hambat Ekstrak Kulit Buah Apel (*Malus sylvestris* Mill.) Varietas Manalagi
Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus viridans*
(*Antibacterial Activity Of Apple Peel (Malus sylvestris Mill.) Variety Of Manalagi*
Extract Against The Growth Of Streptococcus viridans)

Febriana Tria N, Tantin Ermawati, Dwi Warna Aju F
Jurusan Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember (UNEJ)
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
E-mail:tantin.ermawati@gmail.com

Abstrak

Infeksi saluran akar gigi sebagian besar disebabkan oleh *Streptococcus viridans*. Ekstrak kulit buah apel varietas manalagi diduga mampu mengendalikan jumlah populasi *Streptococcus viridans*. Ekstrak tersebut mengandung senyawa antibakteri berupa turunan polifenol (*catechin, chlorogenic acid, quercetin*). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui daya hambat ekstrak kulit buah apel varietas manalagi terhadap pertumbuhan *Streptococcus viridans*. Metode yang digunakan adalah metode difusi sumuran dengan 6 kelompok perlakuan ($n=12$). Masing-masing petridish diisi BHI-A dan diinokulasi *Streptococcus viridans* lalu dibuat 6 lubang sumuran menggunakan sedotan steril (diameter 5 mm). Ekstrak konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%, kontrol positif, dan kontrol negatif masing-masing 5 μ L dimasukkan ke dalam lubang sumuran. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu dilakukan pengukuran zona hambat. Hasil penelitian menunjukkan adanya zona hambat pada seluruh kelompok perlakuan, kecuali kontrol negatif. Dapat disimpulkan ekstrak kulit buah apel varietas manalagi mampu menghambat pertumbuhan *Streptococcus viridans*, sedangkan daya hambat minimal adalah konsentrasi 25%.

Kata kunci : Daya hambat, Ekstrak kulit buah apel varietas manalagi, *Streptococcus viridans*, Metode difusi sumuran.

Abstract

Most of root canal infections are caused by *Streptococcus viridans*. Apple peel variety of manalagi extract are alleged to control the number of *Streptococcus viridans*'s population. This extract contains antibacterial compound such as polyphenols derivative (*catechin, chlorogenic acid, quercetin*). The purpose of this study was to find out antibacterial activity of apple peel extract variety of manalagi against the growth of *Streptococcus viridans*. The method of this study was well diffusion method with 6 treatment groups ($n=12$). Each petridish was filled BHI-A and inoculated by *Streptococcus viridans* followed by making 6 wells using sterile straws (diameter 5 mm). Extracts 100%, 75%, 50%, 25%, positive control, and negative control were added into the wells at concentration of 5 μ L for each material. After that, the incubation was carried out at a temperature of 37°C for 24 hours then inhibitory zones were measured. The results of this study showed that there were inhibitory zones in all treatment groups, except negative control. The conclusion is that apple peel variety of manalagi extract has antibacterial activity against the growth of *Streptococcus viridans* with minimum inhibitory concentration of 25%.

Keywords : Antibacterial activity, Apple peel variety of manalagi extract, *Streptococcus viridans*, Well diffusion method.

Pendahuluan

Streptococcus viridans (*S. viridans*) adalah flora normal rongga mulut dan saluran nafas manusia bagian atas. Namun, pada keadaan tertentu *S. viridans* bersifat patogen (mikroorganisme oportunistik) [1]. Mikroorganisme ini menginvasi dan berkoloni pada pulpa yang terkena karies sehingga menimbulkan infeksi saluran akar gigi. Selain itu *S. viridans* mampu menjadi penyebab utama endokarditis apabila masuk ke dalam peredaran darah [2]-[3].

Saluran akar gigi yang terinfeksi membutuhkan perawatan. Tahap awal perawatan saluran akar gigi adalah preparasi. Tahapan ini terdiri atas instrumentasi dan irigasi.

Irigasi berfungsi sebagai pelumas, pembuang debris, dan antimikroba. Selain itu irigasi juga bertujuan untuk menghilangkan *smear layer*. Salah satu bahan irigasi potensial adalah hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% [4]-[5].

Berdasarkan studi *in vivo* dan *in vitro* belum terdapat bahan irigasi potensial yang ideal dan memenuhi syarat biokompatibilitas [6]. Oleh karena itu banyak dikembangkan penelitian tentang pemanfaatan bahan alam sebagai alternatif pengobatan. Salah satu bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai obat dan banyak terdapat di Indonesia adalah buah apel varietas manalagi. Kulit buah tersebut memiliki kandungan zat antibakteri berupa polifenol [7].

Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan pada saat penelitian adalah *Brain Heart Infusion Agar (BHI-A)*, *Brain Heart Infusion Broth (BHI-B)*, kulit buah apel varietas manalagi, aquades steril, H₂O₂ 3%, etanol 70%, dan bakteri *S. viridans*.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris, dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi. Identifikasi tanaman di Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas MIPA. Pembuatan ekstrak di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Waktu penelitian pada bulan September 2012.

Tahap awal penelitian ini adalah pembuatan ekstrak kulit buah apel varietas manalagi. Kulit buah yang telah dikeringkan tersebut dihaluskan. Setelah itu dimaserasi menggunakan etanol 70%. Larutan hasil maserasi disaring kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak konsentrasi 100%. Derajat keasaman (pH) ekstrak tersebut sebesar 5.

Suspensi *S. viridans* yang digunakan saat penelitian ditumbuhkan dalam media cair BHI-B. Suspensi tersebut diencerkan dengan standar Mc. Farland 0,5. Sebelum melakukan penelitian, terlebih dahulu dilakukan uji identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram. Hasil uji identifikasi terhadap *S. viridans* antara lain bakteri ini berwarna ungu, berbentuk kokus dalam rantai, dan tidak terkontaminasi.

Sebelum tahap uji antibakteri, terlebih dahulu dilakukan pengenceran sediaan ekstrak menjadi beberapa konsentrasi menggunakan metode *serial dilution*. Pada penelitian pendahuluan digunakan metode pengenceran *serial dilution* dengan faktor pengenceran dua kali lipat, yaitu ekstrak konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5%. Namun, ekstrak konsentrasi 12,5% tidak menunjukkan adanya zona hambat (terlihat seperti kontrol negatif). Oleh karena itu pada penelitian ini ekstrak yang digunakan adalah konsentrasi 100%, 50%, 25% dengan modifikasi berupa penambahan konsentrasi 75%. Modifikasi ini bertujuan agar rentang pengenceran ekstrak tidak terlalu jauh.

Aturan pengenceran adalah ekstrak konsentrasi 75% dibuat dengan mengambil 1,5 ml ekstrak 100% dicampur 0,5 ml aquades steril. Ekstrak konsentrasi 50% dibuat dengan mengambil 1 ml ekstrak 100% dicampur 1 ml aquades steril. Ekstrak konsentrasi 25% dibuat dengan mengambil 1 ml ekstrak 50% dicampur 1 ml aquades steril.

Penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran (*well diffusion method*), yaitu dengan membuat lubang sumuran pada sediaan BHI-A yang telah diinokulasi *S. viridans*. Pada masing-masing *petridish* diberi kode perlakuan dan nomor urut. Letak lubang sumuran sesuai dengan kode perlakuan tersebut. Lubang sumuran dibuat menggunakan sedotan steril berdiameter 5 mm. Setelah lubang sumuran dibuat, bahan perlakuan sebanyak 5 µL dimasukkan ke dalam masing-masing lubang sumuran.

Setelah semua perlakuan diberikan seluruh *petridish* dimasukkan ke dalam desikator dan diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah 24 jam akan terlihat daerah jernih di sekeliling

lubang sumuran. Daerah jernih merupakan zona hambat pertumbuhan *S. viridans*. Adapun cara mengukur zona hambat tersebut adalah dengan membalikkan *petridish*, kemudian penghitungan dilakukan dengan cara diameter daerah jernih dikurangi diameter lubang sumuran [8].

Data penelitian dilakukan normalitas dengan uji Kolmogorov Smirnov dan homogenitas dengan uji Levene. Apabila hasil uji menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) maka dilakukan uji statistik parametrik. Apabila hasil uji menunjukkan data tidak terdistribusi normal dan/atau tidak homogen maka dapat dilakukan uji statistik nonparametrik.

Hasil

Hasil penelitian tentang daya hambat ekstrak kulit buah apel varietas manalagi terhadap pertumbuhan *S. viridans* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil penghitungan nilai rata-rata zona hambat pertumbuhan *S. viridans*

Kelompok Perlakuan	n	\bar{x} (mm)	SD
M100	12	10,37	1,85
M75	12	5,54	1,61
M50	12	4,12	1,83
M25	12	2,02	1,13
K(+)	12	12,15	1,76
K(-)	12	0,00	0,00

keterangan :

n : jumlah sampel

\bar{x} : nilai rata – rata zona hambat

SD : standar deviasi (simpang baku) nilai zona hambat

M100 : ekstrak kulit buah apel varietas manalagi 100%

M75 : ekstrak kulit buah apel varietas manalagi 75%

M50 : ekstrak kulit buah apel varietas manalagi 50%

M25 : ekstrak kulit buah apel varietas manalagi 25%

K(+): kontrol positif (H₂O₂ 3%)

K(-) : kontrol negatif (aquades steril)

Setelah mengetahui hasil penghitungan, selanjutnya dilakukan uji distribusi dengan uji Kolmogorov Smirnov. Hasil uji ini menunjukkan jika data terdistribusi normal, dibuktikan dengan nilai signifikansi yang menunjukkan lebih besar dari 0,05. Setelah data dinyatakan terdistribusi normal selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian menggunakan uji Levene untuk mengetahui ragam populasi. Hasil uji Levene menunjukkan nilai signifikansi lebih kecil dari 0,05, sehingga data tersebut dinyatakan tidak homogen. Selanjutnya data dianalisis menggunakan uji non parametrik, yaitu Kruskal Wallis, untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan daya hambat pada seluruh kelompok perlakuan.

Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan signifikansi lebih kecil 0,05, sehingga dapat diketahui jika terdapat perbedaan nilai daya hambat yang bermakna antar kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan uji Mann Whitney untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna. Berdasarkan uji Mann Whitney dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar seluruh kelompok perlakuan.

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa setiap kelompok perlakuan memiliki nilai rata-rata zona hambat yang berbeda. Hal tersebut menunjukkan adanya efektivitas masing-masing kelompok perlakuan dalam menghambat pertumbuhan *S. viridans*. Ekstrak kulit buah apel varietas manalagi konsentrasi 100% memiliki daya hambat yang lebih besar daripada ekstrak konsentrasi 75%, 50% dan 25%. Besar kecilnya suatu bahan antimikroba dalam menghambat pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh konsentrasi bahan, jumlah mikroba, suhu, waktu, jenis mikroba, pH, dan zat atau bahan organik terlarut. Pada konsentrasi yang tinggi suatu bahan akan bekerja dalam waktu yang lebih singkat dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme [9].

Kemampuan ekstrak kulit buah apel varietas manalagi dalam menghambat pertumbuhan *S. viridans* dikarenakan ekstrak tersebut memiliki kandungan polifenol. Turunan polifenol yang terdapat pada kulit buah apel varietas manalagi adalah *catechin*, *chlorogenic acid*, dan *quercetin*. Senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri dengan merusak membran sel, menghancurkan substrat, dan mengganggu fungsi enzim bakteri [10].

Mekanisme *catechin* sebagai antibakteri adalah dengan merusak lapisan lipid pada membran sel bakteri. Kerusakan tersebut menyebabkan kebocoran membran, sehingga fungsi *barrier* menjadi terganggu karena membran merupakan *barrier* selektif keluar masuk zat aktif ke dalam sel dan tempat biosintesis enzim [11]. Kebocoran pada membran sel juga dapat menyebabkan lisis sel [1]. Senyawa *catechin* disintesis dari rantai lurus alkilaldehyd dan metal merkaptan. Kemampuan *catechin* dalam menimbulkan aksi antibakteri dipengaruhi oleh perpanjangan rantai alkilnya, semakin panjang rantai alkil maka akan mempercepat penetrasi *catechin* pada permukaan membran sel bakteri [12].

Chlorogenic acid merupakan turunan polifenol golongan *phenylpropanoid* yang dapat menghambat fungsi *Filamenting temperature sensitive mutant Z* (FtsZ), yaitu bagian dari protein sel esensial bakteri yang memiliki aktivitas *Guanosine triphosphate* (GTPase) dan mampu membentuk protein filamen. *Chlorogenic acid* memiliki gugus hidroksil sehingga bersifat lebih hidrofilik daripada senyawa lain. Gugus hidroksil menyebabkan adanya ikatan hidrogen dengan rantai asam amino pada sisi aktif. FtsZ bereaksi dengan *chlorogenic acid* melalui ikatan tersebut sehingga menyebabkan polimerisasi FtsZ terhambat dan merusak protein filamen. Selain itu *chlorogenic acid* juga menyebabkan kerusakan membran sel bakteri dengan mengganggu lapisan lipid sehingga menyebabkan kebocoran ion dan bahan lain dengan terbentuknya pori serta menghancurkan potensial elektrik membran [13].

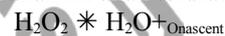
Quercetin memiliki aktivitas antibakteri dengan mengikat *Gyrase B* (GyrB), yaitu sub unit enzim *gyrase* yang berperan dalam replikasi DNA bakteri. Pada proses replikasi DNA terjadi pemisahan rantai bentuk heliks ganda. Enzim *gyrase* berfungsi membuka pilinan rantai DNA. Ikatan *quercetin* dengan GyrB menyebabkan terhambatnya

pembukaan pilinan tersebut, sehingga replikasi DNA terganggu [11].

S. viridans merupakan bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif memiliki struktur yang lebih sederhana daripada dinding sel bakteri Gram negatif, sehingga memudahkan senyawa antimikroba untuk masuk ke dalam sel dan menimbulkan aktivitas antimikroba [14]. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal (15-80 nm) tetapi hanya terdiri atas satu lapisan tunggal dengan komposisi lipid, peptidoglikan dan asam teikoat, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang tipis (10-15 nm) dan terdiri atas tiga lapisan lipid dan peptidoglikan [15].

Daya hambat minimal dapat ditentukan menggunakan metode *serial dilution*. Pada saat penelitian pendahuluan dilakukan pengenceran ekstrak kulit buah apel varietas manalagi secara *serial dilution* berupa konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5%. Namun, ekstrak konsentrasi 12,5% tidak memiliki zona hambat dan terlihat seperti kontrol negatif (aquades steril) sedangkan ekstrak konsentrasi 25% menunjukkan adanya zona hambat yang kecil dibandingkan konsentrasi 100% dan 50%. Berdasarkan penelitian pendahuluan tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak konsentrasi 25% memiliki daya hambat minimal terhadap pertumbuhan *S. viridans*.

H₂O₂ 3% merupakan bahan irigasi saluran akar yang sering digunakan. Bahan ini akan terurai menjadi :



O_{nascent} tersebut akan berubah menjadi oksigen. Gas oksigen yang dihasilkan mampu menghancurkan bakteri saluran akar beserta produknya. Namun, gas oksigen tersebut akan menimbulkan emfisema apabila terbawa ke sirkulasi darah melalui jaringan periapikal [4]. Emfisema lebih rentan terjadi pada penderita yang memiliki kelainan genetik berupa defisiensi alfa₁-antiprotease dan penderita yang hipersensitif terhadap polusi udara [16].

Bahan irigasi kimia seperti H₂O₂ 3% terbukti masih memiliki dampak negatif bagi kesehatan. Implikasi klinis dari ekstrak kulit buah apel varietas manalagi adalah sebagai alternatif bahan irigasi bagi penderita yang hipersensitif terhadap H₂O₂ 3%. Ekstrak tersebut merupakan bahan alami dan telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan *S. viridans*.

Kesimpulan Dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah apel varietas manalagi memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *S. viridans*, sedangkan konsentrasi ekstrak terkecil yang masih mampu menghambat pertumbuhan *S. viridans* adalah konsentrasi 25%.

Adapun beberapa saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan ekstrak kulit buah apel varietas manalagi dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen lain di rongga mulut, dan perlu pula dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan ekstrak polifenol dari kulit buah apel varietas manalagi dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen lain di rongga mulut serta perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai biokompatibilitas ekstrak kulit buah apel varietas manalagi terhadap jaringan lunak

rongga mulut agar dapat diaplikasikan secara nyata di bidang kedokteran gigi.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes sebagai dosen penguji ketua, Dr. drg. Purwanto, M.Kes sebagai dosen penguji anggota, seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi, seluruh staf Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas MIPA, dan seluruh staf Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Daftar Pustaka

- [1] Brooks, G. F., Butel, J. S., dan Morse, S. A. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, dan Aldeberg*. Edisi 1. Alih Bahasa: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Judul Asli: *Jawetz, Melnick, dan Aldeberg's Medical Microbiology*. Jakarta: Salemba Medika (2005).
- [2] Walton, R. E., dan Torabinejad, M. *Prinsip dan Praktis Ilmu Endodontik*. Edisi 3. Alih Bahasa: Narlan Sumawinata. Judul Asli: *Endodontics Principles and Practice*. Jakarta: EGC (2008).
- [3] Brooks, G. F., Butel, J. S., dan Morse, S. A. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, dan Aldeberg*. Edisi 23. Alih Bahasa: Huriawati Hartanto. Judul Asli: *Jawetz, Melnick, dan Aldeberg's Medical Microbiology*. Jakarta: EGC (2007).
- [4] Agustin, D. W. "Perbedaan Khasiat Antibakteri Bahan Irigasi Antara Hidrogen Peroksida 3% dan Infusum Daun Sirih 20% Terhadap Bakteri Mix". *Majalah Kedokteran Gigi*. Vol. 38(1) (2005) 45-47.
- [5] Violich, D.R., dan Chandler, N. P. "The Smear Layer in Endodontic – a Review". *International Endodontic Journal*. Vol 43 (2010) 2-15.
- [6] Yanti, N. *Biokompatibilitas Larutan Irigasi Saluran Akar*. Medan: e- USU Repository (2004).
- [7] Electronic Journal of Biothechnology. Alberto, M. R., Canavosio, M. A. R., dan de Nadra, M. C. M. (2012, April 2). *Antimicrobial Effect of Polyphenols from Apple skin on Human Bacterial Pathogens*. Vol. 9(3). Available: <http://www.ejbiotechnology.info/index/php>.
- [8] Gomes, Ferraz, Garrido, Rosalen, Zaia, Teixeira, dan Souza-Filho. "Microbial Susceptibility to Calcium Hydroxyde Pastes and Their Vechiles". *Journal of Endodontics*. Vol 28(10) (2007) 758-76.
- [9] Pakki, Kasim, Rewa, dan Karangan. "Uji Aktivitas Antibakteri Enzim Papain dalam sediaan krim terhadap *Staphylococcus aureus*". *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. Vol 13(1) (2009) 21- 24.
- [10] Muthuswamy, S., dan Rupasinghe, H. P. V. "Fruit phenolics as natural antimicrobial agents: Selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin". *Journal of Food, Agriculture & Environment*. Vol.5 (3&4) (2007) 81-85.
- [11] Cushnie, T. P. T., dan Lamb, A. J. "Antimicrobial Activity of Flavonoid". *International Journal of Antimicrobial Agent*. Vol 26: (2005) 343-356.
- [12] Kajiya, Hojo, Suzuki, Nanjo, Kumazawa, dan Nakayama. "Relationship between Antibacterial Activity of (+)-Catechin Derivatives and Their Interaction with a Model Membrane". *Agricultural and Foor Chemistry* (2012) 1-5.
- [13] Hemayswarya, Soudaminikkutty, Narasumani, dan Doble. "Phenylpropanoids inhibit protofilament formation of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ". *Journal of Medical Microbiology* 60, (2011) 1317–1325.
- [14] Kusmiyati dan Agustini, N. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas* Vol. 8 (1) (2007) 48-53.
- [15] Siregar, R. M. "Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun dan Bunga Kitolod (*Laurentia longiflora* (L) Peterm) terhadap Bakteri Penyebab Konjungtivitis". Thesis. Bogor; Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor (2012).
- [16] Price, S. A., dan Wilson, L. M. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses- Proses Penyakit*. Edisi 6. Alih Bahasa: Brahm U. Pendit. Judul Asli: *Pathophysiology Clinical Concepts Of Disease Processes*. Jakarta: EGC (2005).