



DAYA HAMBAT EKSTRAK KULIT BUAH NAGA MERAH
(*Hylocereus polyrhizus*) TERHADAP PERTUMBUHAN
Streptococcus mutans

SKRIPSI

Oleh

Chairyah Kartika
NIM 121610101053

BAGIAN MIKROBIOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2015



DAYA HAMBAT EKSTRAK KULIT BUAH NAGA MERAH
(*Hylocereus polyrhizus*) TERHADAP PERTUMBUHAN
Streptococcus mutans

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

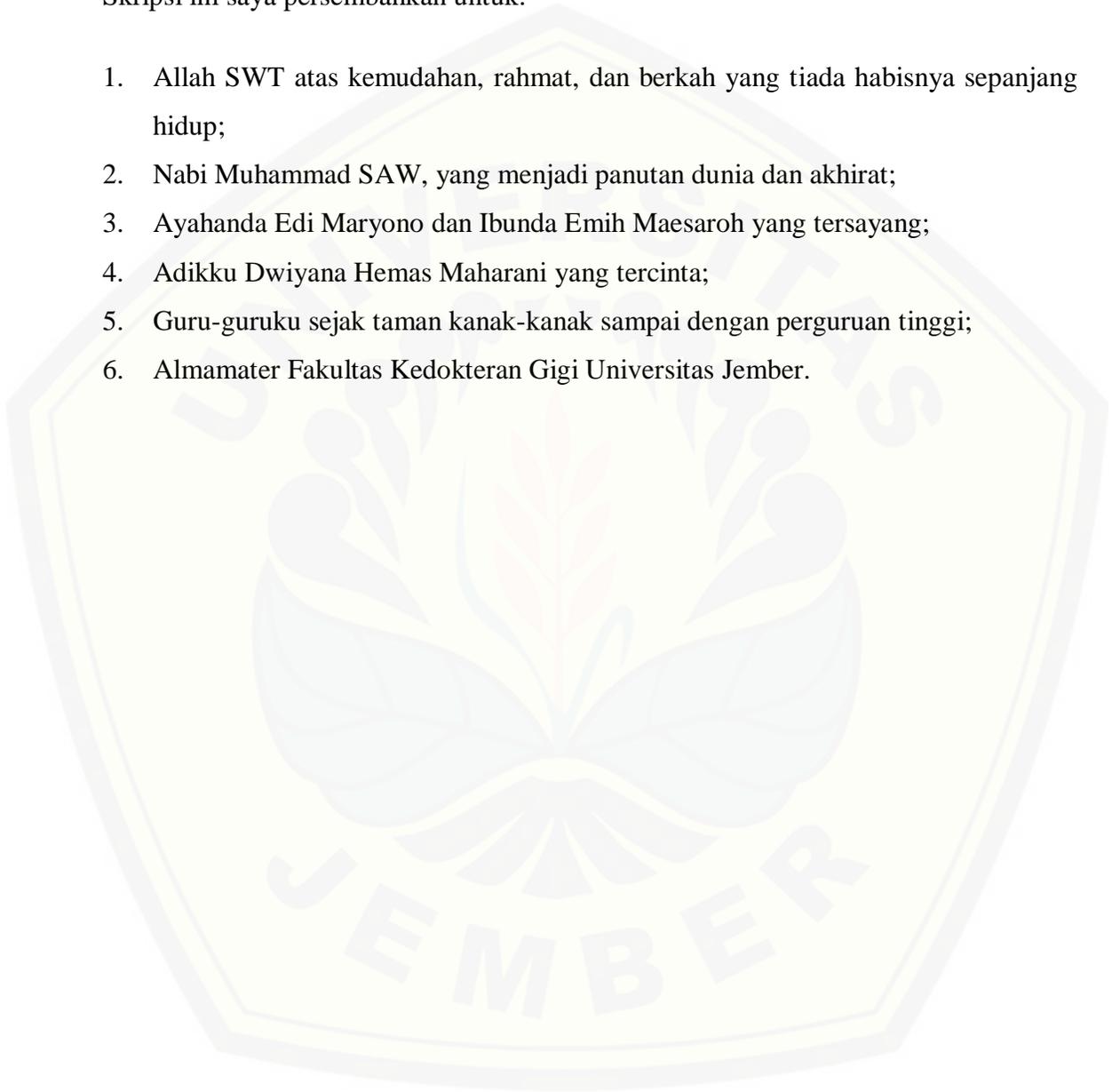
Chairyah Kartika
NIM 121610101053

BAGIAN MIKROBIOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2015

PERSEMBAHAN

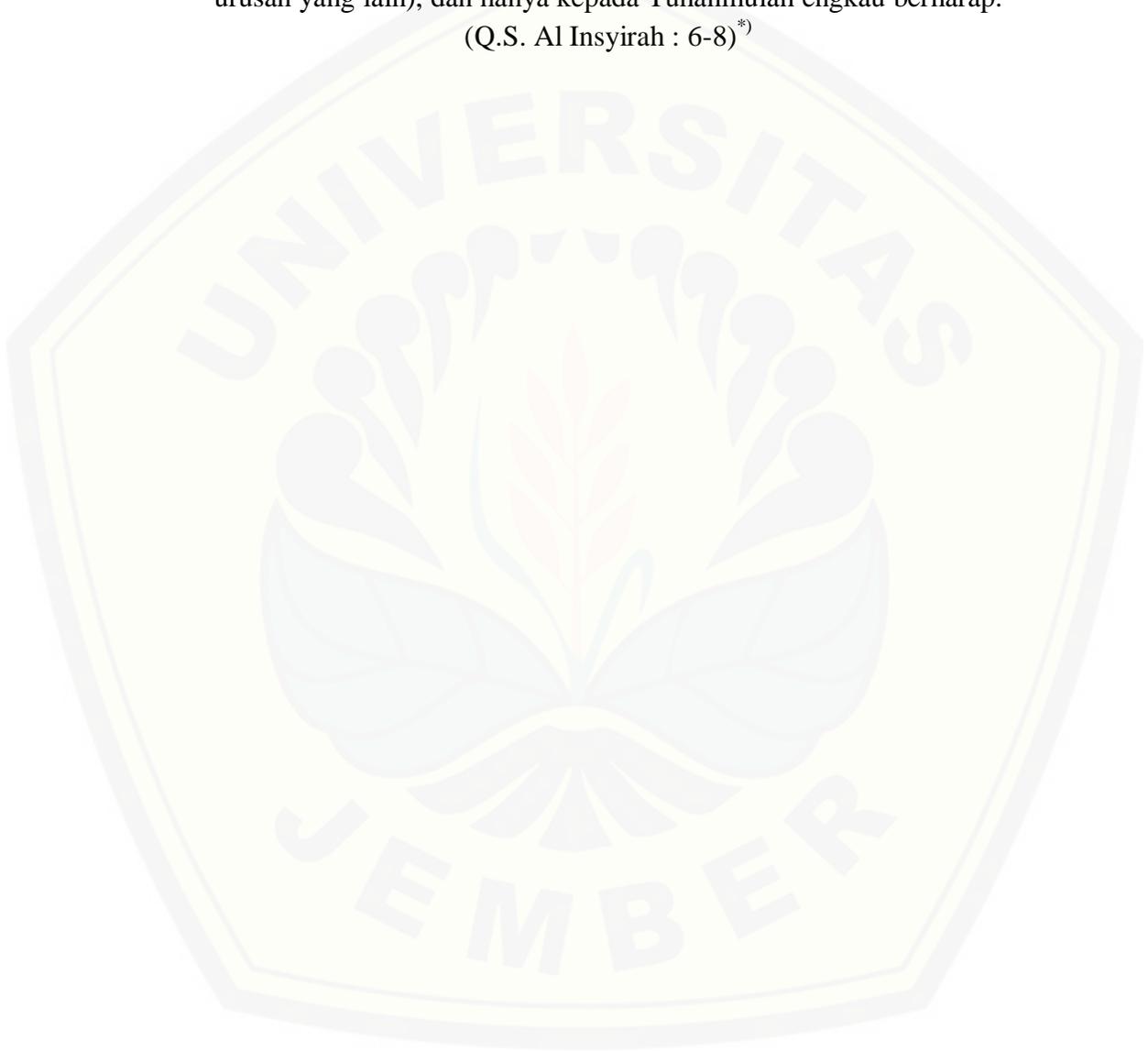
Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas kemudahan, rahmat, dan berkah yang tiada habisnya sepanjang hidup;
2. Nabi Muhammad SAW, yang menjadi panutan dunia dan akhirat;
3. Ayahanda Edi Maryono dan Ibunda Emih Maesaroh yang tersayang;
4. Adikku Dwiyana Hemas Maharani yang tercinta;
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



MOTO

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.
Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.
(Q.S. Al Insyirah : 6-8)^{*)}



^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2013. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Solo: PT Tiga Serangkai Pustaka Mandiri.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

nama : Chairyah Kartika

NIM : 121610101053

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Daya Hambat Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 03 Desember 2015

Yang menyatakan,

Chairyah Kartika

NIM 121610101053

SKRIPSI

**DAYA HAMBAT EKSTRAK KULIT BUAH NAGA MERAH
(*Hylocereus polyrhizus*) TERHADAP PERTUMBUHAN
*Streptococcus mutans***

Oleh

**Chairyah Kartika
NIM 121610101053**

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Yani Corvianindya R., M.KG

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Daya Hambat Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Kamis, 03 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

drg. Melok Aris W., M.Kes., Sp.Perio

NIP 197104092005012002

Penguji Anggota,

drg. H. A. Gunadi, M.S., Ph.D

NIP 195606121983031002

Pembimbing Utama,

drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes

NIP 197608092005012002

Pembimbing Pendamping

drg. Yani Corvianindya R., M.KG

NIP 197308251998022001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost

NIP 196901121996011001

RINGKASAN

Daya Hambat Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*; Chairyah Kartika, 121610101053; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Karies gigi adalah penyakit infeksi yang bersifat progresif serta akumulatif pada jaringan keras gigi. Faktor utama penyebab karies yaitu *host*, mikroorganisme, substrat, dan waktu. Dari faktor mikroorganisme diketahui bahwa *S. mutans* merupakan bakteri plak utama penyebab karies gigi. Bakteri ini berperan dalam proses fermentasi karbohidrat pada plak yang kemudian akan menghasilkan asam dan mengakibatkan terjadinya demineralisasi enamel gigi sehingga terjadi karies. Terdapat beberapa cara untuk menghambat pertumbuhan *S. mutans*, salah satunya dengan cara memanfaatkan tanaman obat yang memiliki efek samping minimal dan mudah diperoleh. Salah satu tanaman tersebut adalah buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). Pada kulit buah naga merah terdapat beberapa senyawa aktif berupa flavonoid, alkaloid, dan terpenoid yang diketahui memiliki daya antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak kulit buah naga merah terhadap pertumbuhan *S. mutans*.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design*. Sampel berjumlah 8 untuk setiap kelompok penelitian. Terdapat 6 kelompok penelitian, yaitu ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 25%, 50%, 75%, 100%, *chlorhexidine* 0,2% (kontrol positif), dan aquades steril (kontrol negatif). Bahan penelitian dari masing-masing kelompok tersebut diisikan masing-masing sebanyak 20 μ L ke dalam lubang sumuran dengan diameter 5 mm pada 8 *petridish* yang berisi media BHI-A yang telah diinokulasi *S. mutans*. Semua *petridish* tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *desicator* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, kemudian

dilakukan pengukuran diameter zona hambat di sekitar sumuran menggunakan jangka sorong digital.

Data hasil penelitian kemudian ditabulasi dan dianalisis secara statistik. Hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada seluruh kelompok penelitian dengan nilai signifikansi $p < 0,05$, yaitu 0,000. Hasil semua uji *Mann-Whitney* antar kelompok penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna, ditandai dengan nilai signifikansi dari semua hasil uji *Mann-Whitney* antar kelompok penelitian lebih kecil dari 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah naga merah dengan konsentrasi 100% memiliki kemampuan lebih besar dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans* dibandingkan ekstrak kulit buah naga merah dengan konsentrasi 75%, 50%, dan 25%.

Perbedaan yang signifikan dari hasil analisis statistik menandakan bahwa terdapat zona hambat yang signifikan pada ekstrak kulit buah naga merah terhadap pertumbuhan *S. mutans*. Terbentuknya zona hambat disekitar sumuran menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah naga merah mengandung senyawa antibakteri berupa flavonoid, alkaloid, dan terpenoid yang dapat bereaksi dengan membran sel, mengganggu penyerapan dan transportasi nutrisi bakteri, mengganggu mekanisme genetik bakteri, dan menghambat metabolisme energi bakteri yang pada akhirnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah naga merah memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *S. mutans*.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Daya Hambat Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusun skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Orang tua tersayang, Bapak Edi Maryono dan Ibu Emih Maesaroh yang tidak pernah berhenti memberikan kasih sayang, doa, motivasi, dukungan, dan semangat;
2. Adik tercinta, Dwiyana Hemas Maharani yang dengan tulus memberikan doa dan dukungan dalam setiap langkah kakaknya;
3. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
4. Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes., selaku Pembantu Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
5. drg. Sri Hernawati, M.Kes., selaku Pembantu Dekan II Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
6. drg. Izzata Barid, M.Kes., selaku Pembantu Dekan III Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Yani Corvianindya R., M.KG., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;

8. drg. Melok Aris W., M.Kes., Sp.Perio., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. H. A. Gunadi, M.S., Ph.D., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
9. drg. Leliana Sandra Devi A.P., Sp.Ort., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam perjalanan studi selama penulis menjadi mahasiswa;
10. Staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
11. Staf Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember;
12. Staf Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan;
13. Sahabat-sahabat tersayang Diol, Dika, Lona, Zala, Gita, Hayyu, Balqis, Arum, Varin, Cici, Defath, Eno, Anis, Elin, Nana, Yusron, Rinda, Ika, Mbak Rere, Mbak Lia, dan Desi yang selalu mendukung dan memberikan semangat dalam mengerjakan skripsi ini;
14. Teman-teman seperjuangan skripsi Naufanisa, Galis, Arfi, Tama, Rina, dan Nasa. Terimakasih atas dukungan dan kerjasamanya;
15. Keluarga Mbak Kris dan Mbak Siska. Terima kasih telah membantu dalam mendapatkan buah naga merah;
16. Seluruh teman-teman FKG 2012. Terima kasih atas motivasi, kerja sama, persaudaraan, dan kekompakkannya selama ini;
17. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 03 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

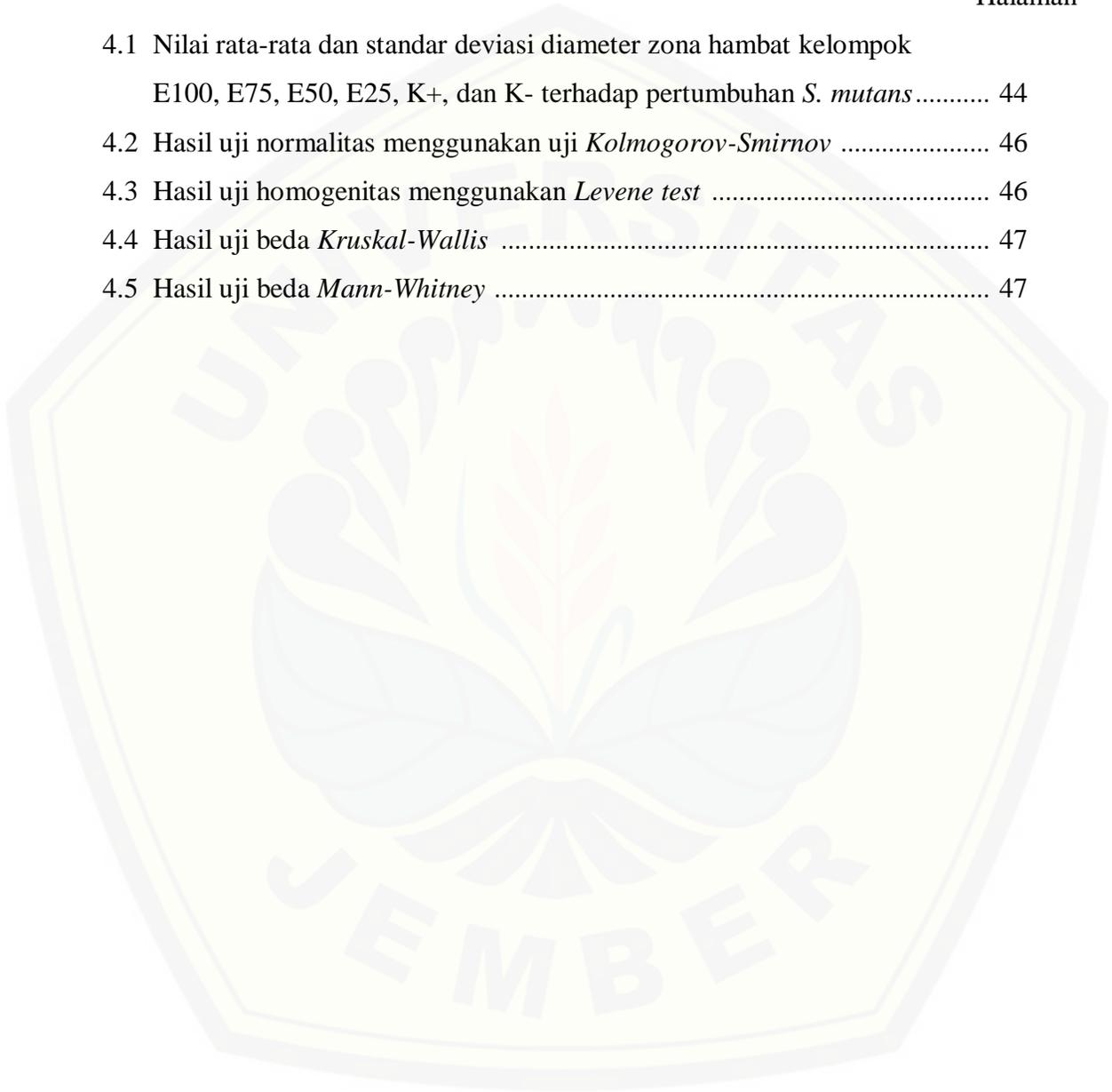
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Umum Buah Naga	5
2.1.1 Klasifikasi Buah Naga	5
2.1.2 Morfologi Buah Naga	5
2.1.3 Buah Naga Merah	6
2.1.4 Habitat Buah Naga	7
2.1.5 Kandungan Kulit Buah Naga Merah	8
2.2 Karies	9
2.2.1 Pengertian Karies	9

2.2.2 Etiologi Karies.....	9
2.2.3 Mekanisme Pembentukan Karies	12
2.3 Streptococcus mutans	13
2.3.1 Klasifikasi <i>S. mutans</i>	13
2.3.2 Morfologi <i>S. mutans</i>	14
2.3.3 Habitat <i>S. mutans</i>	14
2.3.4 Virulensi <i>S. mutans</i>	15
2.3.5 Peranan <i>S. mutans</i> dalam Pembentukan Karies.....	17
2.4 Daya Antibakteri Kulit Buah Naga Merah	18
2.5 Struktur Selubung Sel Bakteri.....	19
2.6 Metode Uji Daya Hambat Well Diffusion	20
2.7 Metode Ekstraksi Tanaman Obat.....	21
2.8 Kerangka Konsep Penelitian.....	23
2.9 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian	23
2.10 Hipotesis.....	24
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	25
3.1 Jenis Penelitian	25
3.2 Rancangan Penelitian	25
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.4 Variabel Penelitian	25
3.4.1 Variabel Bebas	25
3.4.2 Variabel Terikat	25
3.4.3 Variabel Terkendali	26
3.5 Definisi Operasional	26
3.5.1 Ekstrak Kulit Buah Naga Merah	26
3.5.2 Daya Hambat terhadap Pertumbuhan <i>S. mutans</i>	26
3.6 Sampel Penelitian	27
3.6.1 Besar Sampel	27
3.6.2 Pengelompokan Sampel	27

3.6.3 Kriteria Kulit Buah Naga Merah	27
3.7 Alat dan Bahan	28
3.7.1 Alat Penelitian	28
3.7.2 Bahan Penelitian	29
3.8 Prosedur Penelitian	30
3.8.1 Tahap Persiapan	30
3.8.2 Tahap Perlakuan	39
3.8.3 Tahap Pengukuran Diameter Zona Hambat	41
3.9 Analisis Data	42
3.10 Alur Penelitian	43
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	44
4.1 Hasil Penelitian	44
4.2 Pembahasan	48
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	59

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Nilai rata-rata dan standar deviasi diameter zona hambat kelompok E100, E75, E50, E25, K+, dan K- terhadap pertumbuhan <i>S. mutans</i>	44
4.2 Hasil uji normalitas menggunakan uji <i>Kolmogorov-Smirnov</i>	46
4.3 Hasil uji homogenitas menggunakan <i>Levene test</i>	46
4.4 Hasil uji beda <i>Kruskal-Wallis</i>	47
4.5 Hasil uji beda <i>Mann-Whitney</i>	47



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman buah naga (buah, daging, dan biji)	6
2.2 Interaksi faktor etiologi dalam karies gigi	10
2.3 Morfologi <i>S. mutans</i>	14
2.4 Struktur kimia flavonoid, alkaloid, dan terpenoid	18
2.5 Struktur selubung sel bakteri Gram positif dan Gram negatif	20
3.1 Buah naga merah	28
3.2 Kulit buah naga merah yang sudah dicuci bersih, dipotong-potong, dan ditiriskan pada tampah	31
3.3 Kulit buah naga merah yang sudah dikeringkan dengan cara diangin- anginkan dan dioven	32
3.4 Penghalusan, pengayakan dan hasil serbuk simplisia halus	32
3.5 Rendaman simplisia halus kulit buah naga merah dalam etanol 96%	33
3.6 Filtrasi dan evaporasi ekstrak kulit buah naga merah	34
3.7 Alur proses pengenceran ekstrak kulit buah naga merah dan ekstrak kulit buah naga merah yang sudah diencerkan	35
3.8 Morfologi <i>S. mutans</i> dengan perbesaran 1000X	36
3.9 Pemberian kode label pada <i>petridish</i>	38
3.10 Pembuatan 6 lubang sumuran dengan menggunakan <i>borer</i>	39
3.11 Pengisian lubang sumuran dengan kelompok ekstrak kulit buah naga merah dan kelompok kontrol menggunakan mikropipet	40
3.12 Pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong digital dan pengukuran diameter zona hambat yang berbentuk lonjong	42
3.13 Diagram alur penelitian	43
4.1 Histogram nilai rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan <i>S. mutans</i>	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan Jumlah Sampel Penelitian	59
B. Perhitungan Rendemen Ekstrak	60
C. Rumus Pengenceran	60
D. Analisis Data	60
D.1 Hasil Uji Normalitas Menggunakan Uji <i>Kolmogorov-Smirnov</i>	60
D.2 Hasil Uji Homogenitas Menggunakan <i>Levene Test</i>	61
D.3 Hasil Uji Beda <i>Kruskal-Wallis</i>	61
D.4 Hasil Uji Beda <i>Mann-Whitney</i>	62
E. Foto Hasil Penelitian	70
F. Foto Alat dan Bahan Penelitian	71
G. Surat Keterangan	76
G.1 Surat Hasil Identifikasi Buah Naga Merah	76
G.2 Surat Identifikasi Bakteri <i>S.mutans</i>	77
G.3 Surat Hasil Uji Identifikasi <i>S. mutans</i> dengan Pengecatan Gram	78
G.4 Surat Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Naga Merah	79

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karies gigi merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut yang masih perlu mendapat perhatian besar di Indonesia. Menurut hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001 menyatakan, prevalensi terjadinya penyakit gigi dan mulut diantara penyakit yang dikeluhkan dan yang tidak dikeluhkan adalah yang tertinggi, yaitu meliputi 60% penduduk dengan mayoritas penyakit adalah kasus karies gigi dan penyakit periodontal (Natamiharja *et al.*, 2008). Hasil survei ini terus meningkat, diketahui dari hasil Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Nasional tahun 2007, melaporkan bahwa prevalensi karies di Indonesia mencapai 72,1%. Hasil SKRT tahun 2009 juga menunjukkan peningkatan, dimana penduduk Indonesia yang menderita karies gigi sebesar 73% dari seluruh penduduk Indonesia. Prevalensi karies yang tinggi di Indonesia mendorong suatu tindakan pencegahan yang merupakan upaya utama dalam menekan angka prevalensi terjadinya karies gigi (Bidarisugma *et al.*, 2012).

Karies gigi adalah penyakit infeksi yang bersifat progresif serta akumulatif pada jaringan keras gigi yang ditandai dengan kerusakan jaringan, dimulai dari permukaan gigi (pit, fisur, dan daerah interproksimal) hingga meluas ke arah pulpa. Faktor utama penyebab karies yaitu *host*, mikroorganisme, substrat dan ditambah faktor waktu. Dari faktor mikroorganisme telah dilaporkan bahwa *Streptococcus mutans* merupakan bakteri penyebab utama karies gigi (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:39).

Bakteri *S. mutans* merupakan flora normal dalam rongga mulut yang dapat berubah menjadi patogen bila terjadi peningkatan jumlah koloni yang berlebihan. Bakteri ini merupakan bakteri plak utama yang menyebabkan terjadinya karies gigi melalui proses fermentasi karbohidrat pada plak di permukaan gigi. Proses fermentasi karbohidrat akan menghasilkan pembentukan dan penimbunan asam yang

mengakibatkan terjadinya dekalsifikasi dan destruksi enamel gigi sehingga terjadi karies (Putri *et al.*, 2010:71). Penelitian epidemiologi di berbagai populasi yang berbeda menyatakan bahwa pada kasus karies gigi ditemukan bakteri *S. mutans* sebesar 74-94% (Octiara dan Budiardjo, 2008). Sehingga untuk mengurangi resiko terjadinya karies, bakteri ini harus dihambat aktivitasnya (Pratiwi, 2005).

Terdapat beberapa cara untuk menghambat pembentukan plak sehingga dapat mengurangi resiko terjadinya karies, diantaranya dengan cara mekanis dan kimiawi. Cara mekanis dapat dilakukan dengan cara menggosok gigi ataupun penggunaan benang gigi, sedangkan cara kimiawi dilakukan dengan menggunakan *fluoride* atau bahan kimia lainnya. Penggunaan bahan kimia dalam jangka panjang, diketahui memiliki efek samping terhadap rongga mulut, seperti gangguan pengecapian ataupun sensasi rasa terbakar (Farah *et al.*, 2009). Oleh karena itu, perlu dicari alternatif lain misalnya dengan memanfaatkan tanaman sebagai obat herbal yang diduga efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri, memiliki efek samping minimal, dan mudah diperoleh di lingkungan sekitar dengan harga yang relatif lebih murah.

Salah satu tanaman yang diduga memiliki efek antibakteri dan mulai banyak dikonsumsi penduduk Indonesia adalah buah naga. Tanaman buah naga merupakan salah satu tanaman yang banyak dibudidayakan di pulau Jawa, terutama provinsi Jawa Timur. Tanaman yang termasuk dalam genus *Hylocereus* ini memiliki sekitar 16 spesies. Hingga kini terdapat 4 jenis tanaman buah naga yang sedang dibudidayakan dan memiliki prospek baik, salah satunya yang paling sering dikonsumsi masyarakat adalah buah naga merah (Kristanto, 2008:11). Kandungan yang terdapat dalam buah naga adalah vitamin C, vitamin E, vitamin A, serat, likopen, betasianin dan polifenol (Omidzadeh *et al.*, 2014).

Peran senyawa fenol ataupun polifenol dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan produksi toksin bakteri, menyebabkan komponen ini mampu mengubah permeabilitas sel mikroorganisme dan memungkinkan hilangnya makromolekul dalam sel. Senyawa fenol juga dapat berinteraksi dengan protein

membran, menyebabkan perubahan struktur dan fungsionalnya. Aktivitas antibakteri komponen fenol telah terbukti dapat menghambat beberapa jenis bakteri, terutama bakteri gram positif (Davidson *et al.*, 2005:436).

Penelitian yang dilakukan oleh Wu *et al.* (2006) menunjukkan bahwa pada daging dan kulit buah naga merah mengandung salah satu kelompok senyawa fenol, yaitu flavonoid yang bermanfaat bagi tubuh. Diketahui dari ekstrak n-heksan, kloroform dan etanol kulit buah naga merah memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Penelitian yang telah dilakukan oleh Nurmahani *et al.* (2012) menunjukkan hasil yang positif bahwa ekstrak etanol kulit buah naga merah mampu menghambat pertumbuhan beberapa bakteri, antara lain *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, dan *Klebsiella pneumoniae*. Beberapa senyawa aktif pada kulit buah naga merah selain flavonoid yang diduga memiliki aktivitas antibakteri berdasarkan hasil skrining fitokimia adalah alkaloid dan terpenoid (Amalia *et al.*, 2014).

Tanaman buah naga merah telah banyak dibudidayakan di Kabupaten Banyuwangi, tetapi pemanfaatan buah naga merah hanya terpaku pada daging buahnya saja, belum ada pemanfaatan secara optimal terhadap kulit buah naga merah (Amalia *et al.*, 2014). Padahal, diketahui dari hasil penelitian Nurliyana *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa kandungan fenolik total ekstrak etanol kulit buah naga merah lebih tinggi dibandingkan kandungan fenolik total yang terdapat pada daging buahnya. Berdasarkan latar belakang diatas, maka penulis tertarik untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya hambat ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhambat pertumbuhan *S. mutans*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah apakah ekstrak kulit buah naga merah memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *S. mutans*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak kulit buah naga merah memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *S. mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Dapat melengkapi informasi dan sebagai bahan pertimbangan bagi masyarakat mengenai pengaruh daya hambat dari ekstrak kulit buah naga merah terhadap pertumbuhan *S. mutans*.
- b. Dapat memberikan informasi kepada masyarakat dan tenaga kesehatan khususnya dalam mendukung upaya kesehatan gigi dan mulut dengan cara memanfaatkan buah naga merah yang banyak dijumpai di Kabupaten Banyuwangi.
- c. Dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kulit buah naga merah terhadap mikroflora lain pada rongga mulut yang dapat menjadi patogen dalam keadaan tertentu.
- d. Dapat diaplikasikan sebagai obat pencegah karies baik secara sistemik maupun topikal, setelah dilakukan penelitian lebih lanjut, yang diharapkan memiliki efek samping lebih kecil dibandingkan obat yang ada di pasaran.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Buah Naga (*Hylocereus spp.*)

2.1.1 Klasifikasi Buah Naga

Dalam taksonomi tumbuhan, buah naga diklasifikasikan sebagai berikut (Kristanto, 2008:12) :

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Divisi</i>	: <i>Spermatophyta</i> (tumbuhan berbiji)
<i>Subdivisi</i>	: <i>Angiospermae</i> (berbiji tertutup)
<i>Kelas</i>	: <i>Dicotyledone</i> (berkeping dua)
<i>Ordo</i>	: <i>Cactales</i>
<i>Famili</i>	: <i>Cactaceae</i>
<i>Subfamili</i>	: <i>Hylocereanea</i>
<i>Genus</i>	: <i>Hylocereus</i>
<i>Species</i>	: <i>Hylocereus undatus</i> (buah naga daging putih) <i>Hylocereus polyrhizus</i> (buah naga daging merah) <i>Hylocereus costaricensis</i> (buah naga daging super merah) <i>Selenicereus megalanthus</i> (buah naga kulit kuning daging putih)

2.1.2 Morfologi Buah Naga

Tanaman buah naga merupakan tanaman memanjat karena saat ditemukan di alam aslinya, tanaman ini memanjat batang tanaman lain di hutan yang teduh. Walaupun perakarannya dicabut dari tanah, tanaman ini masih tetap hidup sebagai tanaman epifit karena kebutuhan makanannya dapat diperoleh melalui akar udara yang terdapat pada batangnya. Secara morfologis, tanaman ini termasuk tanaman yang tidak lengkap karena tidak memiliki daun. Morfologi tanaman buah naga terdiri dari akar, batang dan cabang, bunga, buah, serta biji (Kristanto, 2008:12).

Perakaran buah naga bersifat epifit, yaitu merambat dan menempel pada batang tanaman lain. Dimana dari akar cabang akan tumbuh akar rambut yang sangat kecil dan banyak. Batang buah naga berukuran panjang dan bentuknya siku atau segitiga. Dari batang dan cabang, tumbuh duri-duri ke atas, tetapi sangat pendek. Bunga tanaman ini merupakan bunga lengkap, dimana panjangnya sekitar 15-36 cm dan lebar 10-23 cm (Warisno dan Dahana, 2010:11). Kuncup bunga yang sudah berukuran panjang sekitar 30 cm akan mulai mekar pada sore hari. Buah naga sendiri berbentuk bulat panjang, berbiji bulat kecil berwarna hitam serta berkulit warna merah dan sangat tebal (Gambar 2.1). Letak buah umumnya mendekati ujung cabang atau batang yang dapat tumbuh buah lebih dari satu. Ketebalan kulit buah 2-3 cm, dimana pada permukaan kulit buah naga terdapat jumbai berukuran 1-2 cm (Kristanto, 2014:18).



Gambar 2.1 (a) Tanaman buah naga; (b) Buah naga; (c) Daging dan biji buah naga
(Sumber: Kristanto, 2014:8,12,18)

2.1.3 Buah Naga Merah

Tanaman yang termasuk dalam genus *Hylocereus* ini memiliki sekitar 16 spesies. Hingga kini terdapat empat jenis tanaman buah naga yang dibudidayakan dan memiliki prospek baik. Keempat jenis tersebut adalah *Hylocereus undatus*,

Hylocereus costaricensis, *Hylocereus polyrhizus*, dan *Selenicereus megalanthus* (Kristanto, 2008:17).

Dari keempat jenis buah naga tersebut, buah naga merah merupakan komoditas hortikultura yang prospektif untuk dikembangkan karena buah naga merah telah terbukti memberikan keuntungan yang tinggi secara komersial, sehingga dapat dijadikan sebagai sumber pendapatan petani (DP3K Kab. Banyuwangi, 2013). Buah naga merah memiliki kulit yang berwarna merah dan daging berwarna merah keunguan. Pada kulit buah terdapat sisik atau jumbai berwarna hijau. Rasa buah naga merah lebih manis dibandingkan buah naga putih karena kadar kemanisannya mencapai 13-15 briks. Tanaman buah naga merah juga lebih kekar dibanding buah naga putih. Duri pada batang dan cabang berjarak lebih rapat. Rata-rata berat buahnya hanya sekitar 400 gr (Kristanto, 2014:20).

2.1.4 Habitat Buah Naga

Tanaman buah naga termasuk tanaman tropis dan sangat mudah beradaptasi pada berbagai lingkungan dan perubahan cuaca seperti sinar matahari, angin, dan curah hujan. Curah hujan yang ideal untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman ini adalah sekitar 60 mm/bulan. Pada curah hujan 600-1.300 mm/tahun pun tanaman ini masih dapat tumbuh. Sementara intensitas sinar matahari yang baik untuk tanaman ini sekitar 70-80%. Tanaman ini dapat tumbuh dan berkembang lebih baik bila ditanam di daerah dataran rendah antara 0-350 m dpl. Suhu udara yang ideal bagi tanaman ini antara 26°-36°C (Kristanto, 2008:22). Agar pertumbuhan dari akar tanaman ini normal, disarankan agar derajat keasaman tanah berada pada kondisi netral, yaitu pH 7. Bila pH tanah dibawah 5, pertumbuhan tanaman menjadi lambat, bahkan kerdil (Kristanto, 2014:21).

Daerah di Indonesia yang kini sudah mengembangkan tanaman buah naga ialah Pasuruan, Jember, Mojokerto, Jombang, dan Banyuwangi. Di Kabupaten Banyuwangi, produksi buah naga menunjukkan peningkatan yang pesat. Tahun 2014

mencapai 28.819 ton dengan luas lahan 1.152 hektar meningkat dibanding tahun 2013 yang hanya 16.631 ton dengan luas lahan yang hanya 678 hektar. Sementara produktivitas buah naga di Banyuwangi pada tahun 2014 sebesar 250 kw/ha, yang juga meningkat dari tahun sebelumnya yang hanya 245 kw/ha (Pemkab Banyuwangi, 2015).

2.1.5 Kandungan Kulit Buah Naga Merah

Dari beberapa media menyebutkan bahwa kulit buah naga merah bermanfaat bagi kesehatan. Adanya manfaat tersebut, disebabkan oleh kandungan nutrisi dan senyawa aktif dalam kulit buah naga merah yang sangat mendukung kesehatan manusia. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Saneto (2012), kandungan nutrisi yang terdapat pada kulit buah naga merah meliputi protein sebesar 3,2%, lemak sebesar 0,7%, abu sebesar 19,3%, karbohidrat sebesar 72,1%, dan serat sebesar 46,7%. Selain itu kandungan air kulit buah naga merah sebesar 4,9% diketahui dapat mencegah pertumbuhan mikroba (Claye *et al.*, 1996).

Selain kandungan nutrisi tersebut, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nurliyana *et al.* (2010) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit dan daging buah naga merah mengandung senyawa fenolik, dimana kandungan fenolik total ekstrak etanol kulit buah naga merah lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanol daging buah naga merah. Salah satu kelompok senyawa fenol yang terdapat di kulit dan daging buah naga merah adalah flavonoid yang terbukti bermanfaat bagi tubuh. Kandungan flavonoid pada daging buah naga merah sebanyak $7,21 \pm 0,02$ mg CE/100 gram daging buah, sedangkan kandungan flavonoid pada kulit buah naga merah sebanyak $8,33 \pm 0,11$ mg CE/100 gram kulit buah (Wu *et al.*, 2006). Flavonoid yang terkandung dalam buah naga merah meliputi myricetin, quercetin, kaempferol, apigenin, luteolin, dan rutin (Omidizadeh *et al.*, 2014). Selain senyawa flavonoid yang terbukti baik bagi kesehatan, kulit buah naga merah juga mengandung senyawa

aktif lainnya. Berdasarkan hasil skrining fitokimia, kulit buah naga merah mengandung senyawa terpenoid dan alkaloid (Amalia *et al.*, 2014).

2.2 Karies

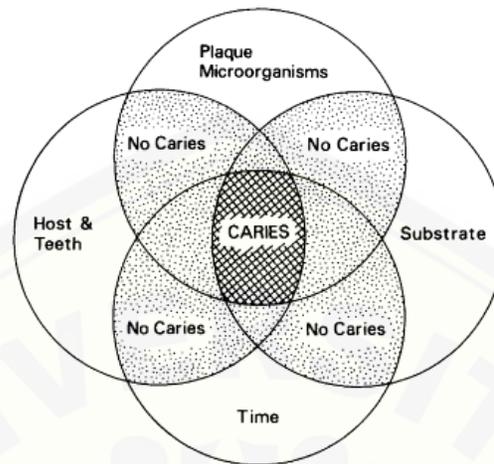
2.2.1 Pengertian Karies

Istilah karies gigi digunakan untuk menggambarkan hasil dari pelarutan kimia lokal permukaan gigi yang disebabkan oleh peristiwa metabolisme yang terjadi dalam biofilm (plak gigi). Interaksi antara deposit mikroba dan jaringan keras gigi dapat mengakibatkan lesi karies yang merupakan tanda atau gejala dari proses karies gigi (Kidd dan Fejerskov, 2008:4).

Pada prinsipnya, lesi karies dapat berkembang di berbagai daerah di rongga mulut, dimana biofilm dapat dibiarkan menumpuk, menetap, dan matang dari waktu ke waktu. Daerah tersebut termasuk, *pit*, *grooves*, dan *fissures* di permukaan oklusal, terutama selama erupsi gigi. Selain itu, permukaan proksimal dari servikal gigi sampai ke titik kontak dan sepanjang margin gingiva juga merupakan daerah yang mudah terjadi akumulasi plak gigi (Kidd dan Fejerskov, 2008:4).

2.2.2 Etiologi Karies

Empat faktor utama yang terlibat dalam proses terjadinya karies gigi, yaitu *host*, mikroorganisme plak, makanan, dan waktu yang diperlukan untuk perkembangan karies (Gambar 2.2). Faktor-faktor yang kompleks ini dapat berinteraksi dengan berbagai cara yang berbeda tetapi semua faktor ini diperlukan untuk inisiasi dan perkembangan lesi karies (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:36).



Gambar 2.2 Interaksi faktor etiologi dalam karies gigi (Sumber: MacFarlane dan Samaranayake, 1989:37)

Empat faktor utama yang terlibat dalam proses karies, antara lain :

a. Faktor *Host*

Dua faktor *host* yang utama adalah struktur dan komposisi enamel maupun aliran saliva. Beberapa daerah pada gigi yang sama dapat lebih rentan terhadap serangan karies daripada yang lain. Kerentanan terhadap demineralisasi, terkait dengan kandungan mineral, terutama *fluoride*, dan struktur daerah tertentu enamel (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:37).

Saliva memiliki sejumlah peran penting dalam menjaga kesehatan gigi, beberapa ada yang berhubungan dengan karies gigi. Tindakan pembersihan mekanis dari saliva merupakan mekanisme yang sangat efektif dalam menghilangkan sisa-sisa makanan dan mikroorganisme mulut. Saliva memiliki kapasitas buffer yang tinggi dan cenderung menetralkan asam yang dihasilkan oleh bakteri plak pada permukaan gigi. Enzim-enzim saliva seperti mucine, zidine dan lisosim yang terdapat dalam saliva mempunyai sifat bakteristatis yang dapat membuat beberapa bakteri mulut menjadi tidak berbahaya (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:37-38).

b. Makanan

Sejumlah penelitian epidemiologi menunjukkan hubungan yang jelas dan langsung antara karies gigi dengan asupan karbohidrat. Gula yang paling kariogenik adalah sukrosa. Sukrosa sangat larut dan berdifusi dengan mudah ke dalam plak gigi. Sukrosa bertindak sebagai bahan untuk produksi polisakarida ekstraseluler dan asam. Meskipun sukrosa tidak diperlukan dalam perlekatan awal sel *S.mutans* pada permukaan gigi, tetapi sukrosa penting untuk perkembangan plak selanjutnya sebagai *adhesive intracellular*. Hal terpenting lainnya adalah kelengketan dan konsentrasi sukrosa yang dikonsumsi. Karbohidrat selain sukrosa, misalnya glukosa dan fruktosa juga bersifat kariogenik tetapi masih kurang kariogenik daripada sukrosa (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:38).

c. Mikroorganisme Plak

Plak gigi merupakan lapisan pada permukaan gigi yang berisi bakteri beserta produk-produknya. Akumulasi bakteri plak tidak terjadi secara kebetulan melainkan terbentuk melalui serangkaian tahapan (Kidd dan Bechal, 1991:2). Jika email yang bersih terpapar di rongga mulut maka akan ditutupi oleh lapisan organik amorf yang disebut pelikel. Pelikel ini terutama terdiri atas glikoprotein yang diendapkan dari saliva dan terbentuk segera setelah penyikatan gigi. Sifatnya sangat lengket dan mampu membantu melekatkan bakteri-bakteri tertentu pada permukaan gigi (Kidd dan Bechal, 1991:3).

Bakteri utama yang mula-mula menghuni pelikel adalah bakteri yang berbentuk kokus. Mikroorganisme tersebut tumbuh, berkembang biak, dan mengeluarkan senyawa ekstraseluler yang lengket dan akan menjerat berbagai bakteri lain. Dalam beberapa hari plak akan bertambah tebal dan terdiri dari berbagai macam mikroorganisme. Akhirnya flora plak yang tadinya didominasi oleh bentuk kokus berubah menjadi flora campuran yang terdiri atas kokus, batang, dan filamen (Kidd dan Bechal, 1991:3). Ada bukti yang menyatakan bahwa beberapa bakteri, seperti

S.mutans, *Lactobacillus spp.*, dan *Actinomycetes spp.* lebih penting daripada yang lain dalam menyebabkan terjadinya karies (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:39).

d. Waktu

Adanya kemampuan saliva untuk mendepositkan kembali mineral selama berlangsungnya proses karies, menandakan bahwa proses karies tersebut terdiri atas periode kerusakan dan perbaikan yang silih berganti. Oleh karena itu, bila saliva ada di dalam rongga mulut, maka karies tidak akan menghancurkan gigi dalam hitungan hari atau minggu, melainkan dalam bulan atau bahkan tahun. Dengan demikian sebenarnya terdapat kesempatan yang baik untuk menghentikan penyakit ini (Kidd dan Bechal, 1991:9).

2.2.3 Mekanisme Pembentukan Karies

Lesi karies gigi terjadi akibat dari perubahan ekologi dan aktivitas metabolik biofilm, dimana terjadi ketidakseimbangan antara mineral gigi dengan cairan biofilm. Penting untuk diketahui bahwa plak gigi yang terbentuk dan tumbuh pada permukaan yang padat tidak selalu menghasilkan perkembangan lesi karies yang terlihat secara klinis. Perkembangan biofilm ditandai dengan aktivitas mikroba yang terus menghasilkan peristiwa metabolisme lanjutan dalam bentuk fluktuasi pH. Metabolisme ini dapat secara signifikan meningkat dengan mengubah kondisi nutrisi di rongga mulut, misalnya dengan menambahkan karbohidrat terfermentasi. Setiap perubahan pH akan mempengaruhi komposisi kimia cairan biofilm dan derajat relatif kejenuhan cairan yang berhubungan dengan mineral penting untuk menjaga komposisi kimia dari permukaan gigi (Kidd dan Fejerskov, 2008:4).

Mulai dari gigi erupsi ke dalam rongga mulut, struktur hidroksiapatit pada permukaan gigi akan terus mengalami perubahan kimia. Dimana perubahan yang terjadi hanya dapat dilihat pada tingkat nano. Permukaan gigi yang sering tertutup oleh biofilm secara bertahap akan terjadi penumpukkan *fluoride* pada lapisan permukaan yang paling luar. Dengan demikian, permukaan enamel dalam keadaan

keseimbangan dinamis dengan lingkungan sekitarnya. Namun, ketika terjadi fluktuasi pH selama beberapa bulan atau tahun maka akan terjadi kehilangan kalsium dan fosfat dalam jumlah besar yang akan membuat enamel terlihat cukup berpori dan berwarna seperti kapur putih secara klinis, kita dapat mendiagnosis sebagai lesi ‘*white spot*’ (Kidd dan Fejerskov, 2008:4). Ketika lesi berkembang, maka permukaan gigi menjadi kasar dan akan terjadi kavitas. Jika lesi tidak segera dilakukan perawatan, maka mikroorganisme dapat memperluas hingga ke dalam dentin dan seringkali akhirnya sampai mengganggu jaringan pulpa gigi (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:35). Hal ini penting untuk diketahui bahwa lesi karies akan muncul hanya ketika terjadi perubahan dalam metabolisme, dimana ketika pH mengalami penurunan dan menyebabkan kehilangan mineral dari permukaan gigi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa lesi karies merupakan akibat dari ketidakseimbangan dalam keseimbangan fisiologis antara mineral gigi dan cairan biofilm (Kidd dan Fejerskov, 2008:4).

2.3 *Streptococcus mutans*

2.3.1 Klasifikasi *S. mutans*

Dalam tata nama bakteri, *S. mutans* diklasifikasikan sebagai berikut (Marsh dan Martin, 2009:25):

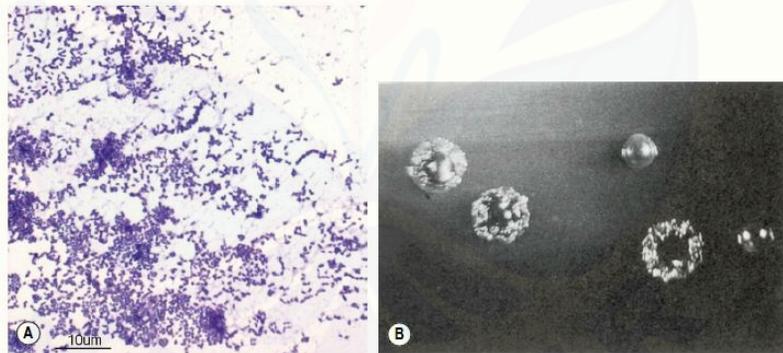
Kingdom : *Prokaryotae*
Divisio : *Firmicutes*
Famili : *Streptococcaceae*
Genus : *Streptococcus*
Species : *Streptococcus mutans*

Bakteri *S. mutans* pada awalnya diisolasi dari karies gigi manusia oleh Clarke pada tahun 1924. Pemberian nama pada bakteri jenis ini berasal dari fakta atas bentuknya yang bulat atau kokus serta berderet memanjang. Terdapat 9 serotipe yang telah diakui dari *S. mutans* (a-h, dan k) berdasarkan serologik spesifik dari antigen

karbohidrat yang berada di dinding sel bakteri (Marsh dan Martin, 2009:30). Saat ini diketahui terdapat tujuh spesies dari kelompok *Mutans streptococci*, yaitu *S. mutans* (serotipe c, e, dan f), *S. sobrinus* (serotipe d dan g), *S. cricetus* (serotipe a), *S. ferus* (serotipe c), *S. rattus* (serotipe b), *S. macacae* (serotipe c), dan *S. downei* (serotipe h). Dimana *S. mutans* dan *S. sobrinus* merupakan jenis yang paling berhubungan erat dengan penyakit manusia, sedangkan jenis yang lain biasanya lebih ditemukan pada hewan (Lamont dan Jenkinson, 2010:7).

2.3.2 Morfologi *S. mutans*

Bentuk *S. mutans* yang bulat atau kokus serta berderet memanjang seperti rantai terjadi karena divisi seluler di sepanjang sumbu tunggal (Gambar 2.3). Bakteri ini merupakan bakteri Gram positif yang bersifat nonmotil dan biasanya ditemukan fibril pada bagian permukaan dengan sesekali berkapsul (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:9).



Gambar 2.3 (a) Morfologi sel *S. mutans* bila dilihat dengan mikroskop cahaya; (b) Morfologi koloni *S. mutans* yang tumbuh pada media agar yang mengandung sukrosa (Sumber: Marsh dan Martin, 2009:31)

2.3.3 Habitat *S. mutans*

Sifat *S. mutans* adalah fakultatif anaerob, artinya dapat hidup dalam keadaan tidak adanya oksigen atau adanya oksigen untuk menghasilkan energi melalui respirasi jika terdapat oksigen dan melalui jalur fermentasi jika ketiadaan oksigen

yang cukup (Samaranayake, 2012:124). Bakteri *S. mutans* merupakan bakteri γ -hemolitik yang umumnya dapat hidup pada pH rendah dan ditemukan pada permukaan gigi (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:9). Bakteri ini paling banyak ditemukan pada gigi posterior dibandingkan gigi anterior, dan lebih banyak ditemukan pada bagian fisur dibandingkan permukaan aproksimal, bukal, ataupun lingual.

2.3.4 Virulensi *S. mutans*

Beberapa ciri yang dimiliki oleh *S. mutans* dan berkontribusi terhadap keberhasilannya sebagai mikroorganisme kariogenik, yaitu (1) kemampuan untuk melekat pada permukaan gigi sehingga meningkatkan akumulasi plak; (2) produksi glukosa dan polisakarida lainnya dari karbohidrat berlebih dalam makanan yang menyebabkan akumulasi plak; (3) produksi asam (terutama asam laktat), yang dapat menghasilkan lingkungan dengan pH rendah dan memperkaya organisme *aciduric* (Lamont dan Jenkinson, 2010:37).

Komponen-komponen yang mempengaruhi virulensi dari *S. mutans* antara lain :

a. Perlekatan Awal pada Permukaan Gigi

Sebuah protein permukaan utama yang dihasilkan oleh *S. mutans* adalah keluarga protein AgI/II yang disebut SpaP (P1). Protein ini memberikan kontribusi untuk lapisan fibril yang berada pada permukaan sel *S. mutans*, terdiri dari protein, polisakarida dan *teichoic acids*. Polipeptida AgI/II dari *S. mutans* ini bertindak sebagai perantara dalam perlekatan pelikel saliva dengan mengikat gp340, glikoprotein saliva, kolagen dan fibronectin. Bakteri ini juga dapat melekat pada kolonisasi *Streptococcus* sebelumnya dengan meningkatkan ikatan dengan molekul gp340 (Lamont dan Jenkinson, 2010:37).

b. Produksi Polisakarida

Polimer glukosa dan fruktan dihasilkan oleh *S. mutans* dari sukrosa makanan melalui proses *glucosyl-* dan *fructosyl-transferase*. Dimana polimer glukosa dan

fruktan tersebut berupa tiga *glucosyltransferase* (GtfB, GtfC, dan GtfD) dan satu *fructosyltransferase* (FTF). Glukan dan fruktan dapat berfungsi sebagai cadangan karbohidrat terfermentasi, yang memungkinkan *S. mutans* untuk terus memetabolisme dan menghasilkan asam ketika karbohidrat makanan tidak lagi tersedia. Bakteri ini memiliki empat protein yang dapat mengikat glukan, yaitu GbpA, GbpB, GbpC, dan GbpD. Glukan yang tidak larut air juga dapat membantu kohesi dan retensi dari plak yang kaya akan *S. mutans*. Dalam sitoplasma, glukosa dapat dipolimerisasi menjadi polisakarida intraseluler yang dapat berguna untuk glikolisis dan memperpanjang durasi pengasaman (Lamont dan Jenkinson, 2010:37).

c. Produksi Asam

Berbagai gula dapat dimetabolisme oleh *S. mutans* yang akan menghasilkan sejumlah asam lemah, termasuk asam laktat, asam format dan asam asetat. Ketika pH plak turun dibawah 5,5 keseimbangan antara demineralisasi dan remineralisasi enamel bergeser menuju kelarutan dan proses karies dimulai. Sukrosa adalah gula yang paling kariogenik karena dapat diolah menjadi glukan, fruktan, dan efisien jika difermentasi menjadi asam laktat. Enzim laktat dehidrogenase (LDH) mampu mengubah hasil glikolisis yaitu asam piruvat menjadi asam laktat dengan menggunakan Nikotinamida Adenosin Dinukleotida Hidrogen (NADH) sebagai donor elektron. LDH bertanggung jawab dalam produksi asam laktat yang berperan dalam virulensi *S. mutans* karena asam ini merupakan asam yang paling kuat dengan konstan ionisasi (pKa) 3,5 yang diproduksi dalam kuantitas besar oleh *S. mutans* (Lamont dan Jenkinson, 2010:37).

d. Toleransi Asam

Sifat *S. mutans* sangat *aciduric*. Resistensi terhadap efek yang merugikan dari pH rendah dapat dilakukan dengan beberapa mekanisme, yaitu dengan ekstrusi ion H^+ dari sel melalui translokasi proton F1-ATPase F0 yang akan mempertahankan pH sitoplasma lebih dekat dengan pH fisiologis dan melalui peningkatan proporsi *mono-*

unsaturated membrane fatty acids yang akan menurunkan permeabilitas proton (Lamont dan Jenkinson, 2010:37).

e. Adaptasi Biofilm

Produksi bakteriosin oleh *S. mutans* dapat membantu bakteri ini beradaptasi dalam biofilm dan bersaing pada keadaan nutrisi yang terbatas. Bakteriosin adalah peptida yang disintesis oleh ribosom dan berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain dengan cara memperoleh DNA dari organisme lain di dekatnya baik untuk memperoleh nutrisi atau meningkatkan keragaman genetik. Proses ini dikendalikan oleh *competence stimulating peptide* (Lamont dan Jenkinson, 2010:37).

2.3.5 Peranan *S. mutans* dalam Pembentukan Karies

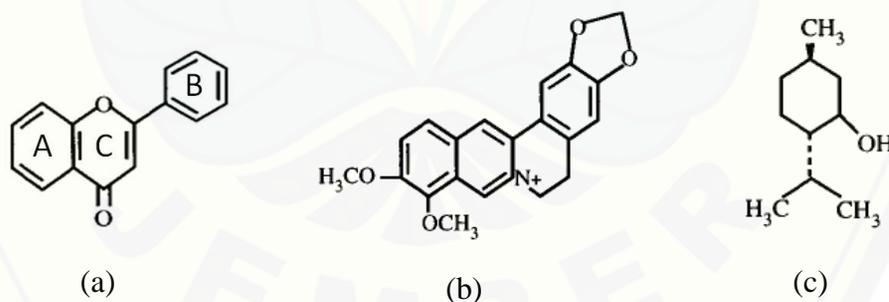
Bakteri *S. mutans* merupakan inisiator dalam karies karena memiliki berbagai faktor virulensi unik yang telah diisolasi dan terbukti memiliki peran penting dalam pembentukan karies. Pertama, *S. mutans* adalah bakteri anaerob yang diketahui dapat memproduksi asam laktat sebagai bagian dari metabolismenya. Kedua, kemampuan *S. mutans* untuk mengubah sukrosa menjadi glukosa yang tidak larut dalam air, yang dapat membantu mengikat bakteri pada permukaan gigi. Glukosa yang tidak larut dalam air juga terbukti dapat menurunkan konsentrasi kalsium dan fosfat dari saliva, sehingga mengurangi kemampuan saliva untuk memperbaiki kerusakan gigi yang disebabkan oleh produksi asam laktat bakteri (Napimoga *et al.*, 2004). Sifat *S. mutans* yang asidofilik dapat menyebabkan bakteri ini tumbuh subur dalam kondisi asam dan menjadi bakteri yang berperan dalam penurunan pH rongga mulut secara permanen (Simon, 2007).

Selain itu, tidak seperti spesies lain di dalam plak yang metabolismenya akan melambat jika berada di lingkungan dengan pH rendah, metabolisme *S. mutans* justru akan meningkat karena menggunakan *proton motive system* untuk mengangkut nutrisi melalui dinding sel di lingkungan dengan pH rendah (Hamilton dan Martin, 1982). Dengan cara ini, *S. mutans* akan terus menurunkan atau mempertahankan pH mulut

dalam kondisi yang asam. Hal ini akan menciptakan kondisi yang menguntungkan bagi metabolisme *S. mutans* tetapi tidak menguntungkan bagi spesies lain. Penurunan pH yang terjadi terus menerus akan merangsang demineralisasi dan kavitas pada gigi, dimana kedua hal ini akan meningkat seiring dengan meningkatnya jumlah *S. mutans* dan pada akhirnya menyebabkan karies gigi (Simon, 2007).

2.4 Daya Antibakteri Kulit Buah Naga Merah

Daya antibakteri merupakan kemampuan suatu zat atau senyawa dalam membunuh atau menekan pertumbuhan atau reproduksi bakteri (Dorland, 2012:68). Mekanisme aksi penghambatan pertumbuhan oleh senyawa antibakteri dapat berupa reaksi dengan membran sel, perubahan permeabilitas membran sitoplasma, gangguan penyerapan dan transportasi nutrisi, inaktivasi enzim penting, gangguan mekanisme genetik, atau penghambatan sintesis protein (Davidson *et al.*, 2005:5). Berdasarkan hasil analisis fitokimia terhadap kulit buah naga merah menunjukkan adanya senyawa antibakteri berupa flavonoid (Wu *et al.*, 2006), alkaloid, dan terpenoid (Amalia *et al.*, 2014).



Gambar 2.4 (a) Struktur kimia flavonoid; (b) Struktur kimia alkaloid; (c) Struktur kimia terpenoid (Sumber: Cowan, 1999:570)

Flavonoid (Gambar 2.4a) merupakan salah satu golongan senyawa fenol yang terdiri dari dua cincin aromatik terkait melalui tiga karbon yang biasanya membentuk heterosiklik oksigen (Bravo, 1998). Flavonoid terbukti memiliki kemampuan sebagai

antijamur, antivirus, dan antibakteri. Terdapat tiga mekanisme antibakteri dari flavonoid, yaitu dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi dari bakteri (Cushnie dan Lamb, 2005).

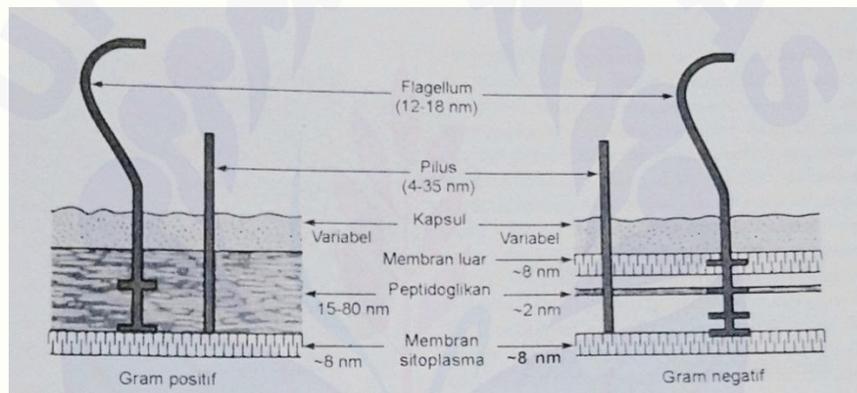
Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang paling banyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Alkaloid (Gambar 2.4b) merupakan senyawa nitrogen heterosiklik yang mengandung paling sedikit satu atom nitrogen dan bersifat basa (Lenny, 2006). Alkaloid memiliki aktivitas sebagai antibakteri karena senyawa ini dikenal sebagai interkalator DNA dan pengambat sintesis DNA (Karou *et al.*, 2005).

Selain flavonoid dan alkaloid, aktivitas antibakteri kulit buah naga merah juga diduga berasal dari senyawa terpenoid. Terpenoid (Gambar 2.4c) merupakan sebuah fraksi besar dari minyak esensial tanaman yang terdiri dari struktur isoprena alam lipofilik (Lamothe *et al.*, 2009). Kemampuan terpenoid sebagai senyawa yang mempunyai sifat antibakteri dikaitkan dengan mekanisme kerja dari senyawa ini yang dapat bereaksi dengan protein transmembran (porin) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya nutrisi dan senyawa lain akan mengurangi permeabilitas dinding sel, sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat atau mati (Cowan, 1999).

2.5 Struktur Selubung Sel Bakteri

Lapisan yang mengelilingi sel secara keseluruhan disebut sebagai selubung sel. Struktur dan susunan selubung sel antara bakteri Gram positif dan Gram negatif berbeda (Gambar 2.5). Pada kenyataannya, perbedaan inilah yang membagi 2 kelompok utama spesies bakteri.

Struktur selubung sel pada Gram positif relatif sederhana, terdiri dari dua sampai tiga lapisan, yaitu membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang tebal. Berbeda dengan bakteri Gram negatif yang memiliki struktur selubung sel yang berlapis banyak dan sangat kompleks. Membran sitoplasma (membran dalam) bakteri Gram negatif dikelilingi oleh lembaran tunggal peptidoglikan bentuk planar yang dilekati oleh lapisan luar yang disebut membran luar. Ruang diantara membran dalam dan membran luar disebut ruang periplasma. Kesederhanaan struktur selubung sel yang dimiliki oleh bakteri Gram positif yang menyebabkan bakteri ini, salah satunya *S.mutans* lebih rentan terhadap bahan antimikrobal (Brooks *et al.*, 2007:15).



Gambar 2.5 Perbandingan struktur selubung sel bakteri Gram positif dan Gram negatif (Sumber: Brooks *et al.*, 2007:15)

2.6 Metode Uji Daya Hambat *Well Diffusion*

Metode uji daya hambat pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui respon mikroorganisme terhadap senyawa antibakteri yang diujikan, sehingga dapat dilakukan pengobatan yang efektif dan efisien. Saat ini terdapat tiga metode untuk mendeteksi aktivitas antibakteri dalam suatu produk alam, yaitu metode autobiografik, difusi, dan dilusi. Metode autobiografik dan difusi diketahui merupakan metode kualitatif yang hanya akan memberikan kepastian ada atau tidaknya zat antibakteri dalam suatu produk alam. Sedangkan, metode dilusi

merupakan metode kuantitatif yang dapat menentukan konsentrasi hambat minimal dari suatu produk alam yang mengandung senyawa antibakteri (Valgas *et al.*, 2007).

Metode yang digunakan untuk mengetahui daya hambat ekstrak kulit buah naga merah dalam penelitian ini adalah *well diffusion* (difusi sumuran) yaitu salah satu metode difusi dengan cara membuat sumuran pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri dan diisi dengan ekstrak kulit buah naga merah dengan berbagai konsentrasi serta larutan *chlorhexidine* 0,2% dan aquades steril pada masing-masing sumuran yang sudah dibuat. Metode ini memiliki sensitivitas tinggi dalam menguji kepekaan zat antibakteri dan merupakan metode yang paling cocok untuk menguji daya antibakteri dari suatu zat yang berbentuk cair dari ekstrak etanol suatu tanaman. Zat-zat dari ekstrak tanaman akan lebih mudah berdifusi melewati media agar pada metode ini (Valgas *et al.*, 2007).

2.7 Metode Ekstraksi Tanaman Obat

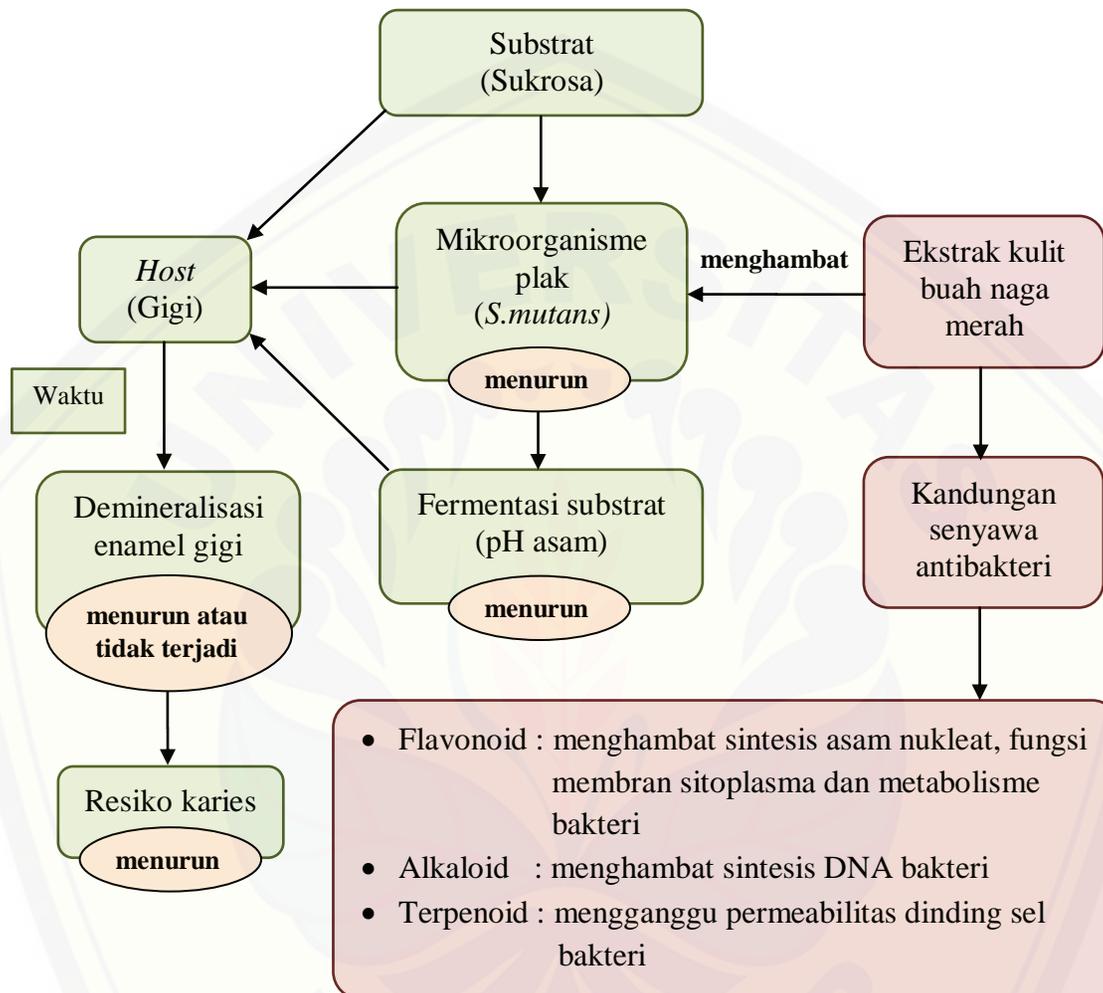
Dalam buku Farmakope Indonesia Edisi V, disebutkan bahwa ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Ditjen Binfar dan Alkes, 2013:42). Sedangkan Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair (Ditjen POM, 2000:5).

Salah satu metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut dalam buku Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat adalah metode maserasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi, maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Ditjen POM, 2000:10). Pada metode maserasi ini, cairan pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif

sehingga zat aktif akan terlarut. Adanya perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam maupun di luar sel maka larutan yang terpekat akan terdesak keluar. Peristiwa ini terus berulang sampai terjadinya keseimbangan konsentrasi larutan antara di dalam dan di luar sel (Ditjen POM, 1986).

Cairan pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Etanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan untuk ekstraksi karena memiliki daya pelarut yang luas. Etanol dapat menarik senyawa yang bersifat polar sampai non polar karena memiliki gugus polar (-OH) dan non polar (-CH₃) dalam struktur kimianya. Hal ini didasarkan pada hasil *review* oleh Cowan (1999) yang menyatakan bahwa pelarut etanol dapat mengekstraksi beberapa senyawa aktif seperti tanin, polifenol, flavonol, terpenoid, dan alkaloid. Selain itu diketahui juga bahwa etanol memiliki toksisitas rendah dibanding pelarut organik lain, seperti metanol, kloroform, heksana, dan lain-lain (Saifudin *et al.*, 2011:72).

2.8 Kerangka Konsep Penelitian



2.9 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian

Pada prinsipnya, lesi karies dapat berkembang disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain substrat, mikroorganisme plak, *host*, dan waktu. Adanya faktor substrat, dalam hal ini sukrosa yang bersifat paling kariogenik bertindak sebagai bahan untuk memproduksi polisakarida ekstraseluler dan asam melalui proses fermentasi substrat yang dilakukan oleh mikroorganisme rongga mulut (MacFarlane dan Samaranayake, 1989:36-38). Dari faktor mikroorganisme telah diketahui bahwa *S. mutans*

merupakan mikroorganisme plak utama yang berperan dalam proses fermentasi substrat yang kemudian akan menghasilkan pembentukan dan penimbunan asam, dimana peristiwa ini akan meningkatkan akumulasi plak pada permukaan gigi. Ketika terjadi fluktuasi pH rongga mulut karena fermentasi substrat selama beberapa bulan atau tahun, maka akan terjadi destruksi atau demineralisasi enamel gigi yang akan berkembang menjadi karies jika tidak segera dilakukan perawatan (Putri *et al.*, 2010:71).

Oleh karena itu, diperlukan suatu mekanisme yang dapat mencegah terjadinya proses karies gigi. Salah satunya dengan pemanfaatan tanaman obat yang mengandung senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme penyebab karies, yaitu *S. mutans*. Salah satu tanaman obat yang diketahui memiliki daya antibakteri adalah kulit buah naga merah yang mengandung beberapa senyawa aktif, seperti flavonoid (Wu *et al.*, 2006), alkaloid, dan terpenoid (Amalia *et al.*, 2014). Mekanisme dari ketiga senyawa ini sebagai antibakteri dapat berupa reaksi dengan membran sel bakteri sehingga fungsi membran sel terhambat, penghambatan sintesis asam nukleat bakteri, penghambatan metabolisme bakteri, dan perubahan permeabilitas dinding sel bakteri (Davidson *et al.*, 2005:5).

2.10 Hipotesis

Ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *S. mutans*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris. Dipilih jenis ini karena baik sampel maupun perlakuan lebih terkontrol, terukur dan pengaruh perlakuan lebih dapat dipercaya.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan *the post-test only control group design*, yaitu dilakukan pengukuran atau pengamatan pada kelompok kontrol dan perlakuan pada waktu yang telah ditentukan setelah diberi suatu perlakuan.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di bagian Biomedik laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi Kabupaten Pasuruan, dan laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai November 2015.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75 % dan 100%.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah zona hambat ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap pertumbuhan *S. mutans*.

3.4.3 Variabel Terkendali

- a. Sterilisasi alat dan bahan
- b. Metode dan cara kerja
- c. Ekstraksi kulit buah naga merah
- d. Suspensi *S. mutans*
- e. Media pembiakan *S. mutans*

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Ekstrak Kulit Buah Naga Merah

Ekstrak kulit buah naga merah adalah hasil ekstrak yang diperoleh dari kulit buah naga merah yang dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 4 hari dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 50°C selama 1 jam kemudian dihaluskan hingga berbentuk serbuk simplisia lalu dimaserasi dengan larutan etanol 96% selama 3 hari kemudian disaring. Maserat diuapkan sampai didapat ekstrak dengan konsentrasi 100%. Ekstrak 100% merupakan ekstrak kental dengan hasil rendemen 6,97% (b/b). Pada penelitian ini dibuat pengenceran konsentrasi ekstrak kulit buah naga merah hingga didapatkan ekstrak kulit buah naga merah dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%.

3.5.2 Daya Hambat terhadap Pertumbuhan *S. mutans*

Daya hambat terhadap pertumbuhan *S. mutans* adalah kemampuan suatu zat dalam menghambat pertumbuhan dan reproduksi *S. mutans* dengan cara mengukur diameter zona hambat di sekitar sumuran pada masing-masing kelompok penelitian menggunakan jangka sorong digital. Diameter zona hambat diukur dari tepi (*break point*) ke tepi (*break point*) zona hambat yang bersebrangan melewati pusat lubang sumuran. Jika tidak terdapat zona hambat di sekitar lubang sumuran, maka dikatakan nilai diameter zona hambat sebesar 0,00 mm.

3.6 Sampel Penelitian

3.6.1 Besar Sampel

Besar sampel didapat dengan penghitungan rumus dari Steel dan Torrie (1995:145), yaitu berjumlah minimal 8 sampel untuk setiap kelompok penelitian. Sehingga jumlah keseluruhan besar sampel dari 6 kelompok penelitian yang digunakan adalah sebanyak 48 sampel (Lampiran A).

3.6.2 Pengelompokan Sampel

Sampel dibagi menjadi 6 kelompok penelitian, yaitu sebagai berikut:

- a. Kelompok K+ : *chlorhexidine* 0,2% (kontrol positif)
- b. Kelompok K- : aquades steril (kontrol negatif)
- c. Kelompok E 100 : ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 100%
- d. Kelompok E 75 : ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 75%
- e. Kelompok E 50 : ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 50%
- f. Kelompok E 25 : ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 25%

3.6.3 Kriteria Kulit Buah Naga Merah

Kriteria buah naga merah yang akan diambil kulitnya dalam penelitian ini adalah sebagai berikut (Gambar 3.1):

- a. Buah naga merah segar dengan berat rata-rata 350-500 gram yang dipetik dari daerah perkebunan buah naga di Kecamatan Purwoharjo, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur.
- b. Buah naga merah yang sudah siap petik atau yang sudah tua dengan karakteristik kulit buah sudah berubah warna menjadi merah tua, mahkota buah sudah mengecil, jumbai buah sudah berubah warna menjadi warna kemerahan dan kedua pangkal buah sudah keriput.



Gambar 3.1 Buah Naga Merah

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat Penelitian

- a. Pisau *stanless steel*
- b. Tampah
- c. Wadah toples kaca bertutup
- d. Ayakan 80 mesh
- e. Blender (Miyako, Indonesia)
- f. Kompor gas (Rinai, Indonesia)
- g. Timbangan digital (Electronic Balance, BS 600 H, USA)
- h. Neraca (Cent-O-gram Ohaus, tipe 311, USA)
- i. *Beaker glass* (Pyrex, Japan)
- j. Tabung *erlenmeyer* (Pyrex, Japan)
- k. Gelas ukur (Pyrex, Japan)
- l. Corong kaca (Herma, Japan)
- m. *Petridish* tidak bersekat dengan diameter 9 cm (Pyrex, Germany)
- n. Tabung reaksi (Pyrex, Japan)
- o. Bunsen (Pyrex, Japan)
- p. Cawan uap porselen
- q. Gelas takaran (Kirapak, Indonesia)
- r. Kertas saring (Whatman No. 40, UK)
- s. Alumunium foil (Klin Pak, Indonesia)

- t. Panci (Eagle, Indonesia)
- u. Spatula kaca
- v. Spatula laboratorium *stainless steel*
- w. *Borer stainless steel* dengan diameter 5 mm
- x. Ose
- y. Gigaskrin
- z. Kaki tiga
- aa. Mikropipet (Eppendorf, Germany)
- bb. Tip kuning
- cc. *Syringe* (One-Med, Indonesia)
- dd. Termometer (Isolab, Germany)
- ee. Jangka sorong digital dengan derajat ketelitian 0,01 mm (Inoki, Japan)
- ff. Oven (Mettler GmbH + Co. KG, tipe 300, Germany)
- gg. *Rotary evaporator* (Heidolph, Laborota 4000, German)
- hh. *Incubator* (WTC Binder, Germany)
- ii. *Spektrofotometer* (Milton Roy, Spektronik 20⁺, Germany)
- jj. *Thermolyne* (Maxi Mix II, tipe 37600 mixer, USA)
- kk. *Laminar flow* (Super Clean Bench, HF-100, Korea)
- ll. *Desicator* (Duran, Germany)
- mm. *Hotplate* (Thermo Scientific, USA)
- nn. *Autoclave* (Hanshin Medical Co., Ltd., HS-85E, Korea)
- oo. *Object glass*
- pp. *Deck glass*
- qq. Mikroskop (Olympus, X21LED, Japan)

3.7.2 Bahan Penelitian

- a. *Brain Heart Infusion Agar/BHI-A* (Merck, Germany)
- b. *Brain Heart Infusion Broth/BHI-B* (Merck, Germany)

- c. Aquades steril (Otsuka, Indonesia)
- d. Obat kumur yang mengandung *chlorhexidine* 0,2% (Minosep, Indonesia)
- e. Kulit buah naga merah (Purwoharjo, Banyuwangi)
- f. Bakteri *S. mutans* (Isolat klinik dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan/BBLK Surabaya)
- g. Etanol 96%
- h. Alkohol 70%
- i. Larutan PZ
- j. Minyak emersi
- k. *Carbol gentian violet*
- l. *Lugol*
- m. *Safranin*
- n. *Selective decolorizer*

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahap Persiapan

- a. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dibersihkan terlebih dahulu dan disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Sedangkan alat yang terbuat dari plastik dicuci sampai bersih, kemudian dikeringkan dan disterilkan dengan menggunakan alkohol 70%.

- b. Persiapan Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

1. Identifikasi Tanaman Buah Naga Merah

Sebelum digunakan dalam penelitian, buah naga merah yang akan digunakan dilakukan identifikasi terlebih dahulu di Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur (Lampiran G.1).

2. Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Naga Merah

Pembuatan ekstrak, dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember dengan beberapa tahapan. Pertama, buah naga merah sebanyak 6 kg dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian dikupas untuk mengambil kulitnya. Kulit buah naga merah yang sudah bersih dipotong-potong menggunakan pisau *stainless steel* lalu ditimbang berat basahanya dan diperoleh berat sebanyak 1,7 kg. Potongan kulit buah naga merah kemudian ditiriskan pada tampah untuk menghilangkan sisa air (Gambar 3.2).



Gambar 3.2 (a) Kulit buah naga yang sudah dicuci bersih dan dipotong-potong;
(b) Kulit buah naga merah yang ditiriskan pada tampah

Kulit buah naga merah kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang teduh selama 4 hari. Kulit buah naga merah yang sudah diangin-anginkan kemudian dioven dengan suhu 50°C selama 1 jam (Gambar 3.3). Suhu pengeringan harus memenuhi standar yaitu tidak lebih dari 60°C . (Kemenkes RI, 2009:5). Setelah dikeringkan, kulit buah naga merah ditimbang dan diperoleh berat kering sebanyak 91 gr.



Gambar 3.3 (a) Kulit buah naga merah yang dikeringkan dengan cara diangin-anginkan; (b) Kulit buah naga merah yang sudah dioven

Kulit yang sudah kering dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan menggunakan blender. Serbuk kemudian diayak dengan menggunakan ayakan berukuran 80 mesh sehingga menjadi serbuk simplisia halus (Kemenkes RI, 2009:174). Hasil serbuk simplisia halus yang diperoleh sebanyak 85,92 gr (Gambar 3.4). Kemudian sediaan ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarut.



Gambar 3.4 (a) Penghalusan simplisia dengan cara diblender; (b) Pengayakan serbuk simplisia; (c) Hasil serbuk simplisia halus

Serbuk simplisia halus sebanyak 85,92 gr dimasukkan ke dalam toples lalu direndam dengan etanol 96% sebanyak 645 ml sesuai perbandingan 1:7,5 (b/v) antara banyaknya serbuk simplisia dengan pelarut. Perendaman dilakukan selama 3 hari di dalam wadah toples tertutup pada suhu ruangan dengan dilakukan pengadukan larutan 2 kali sehari (Gambar 3.5).



Gambar 3.5 Rendaman simplisia halus kulit buah naga merah dalam etanol 96%

Serbuk simplisia yang sudah selesai direndam selama 3 hari kemudian disaring. Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi menggunakan corong kaca yang diberi kertas saring. Hasil maserasi kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 50°C selama 1 jam dan diuapkan kembali dengan cara *waterbath* di atas *hotplate* untuk menghilangkan sisa pelarut pada suhu 40-50°C selama 3 jam (Gambar 3.6). Ekstrak kental kulit buah naga merah yang diperoleh sebanyak 5,99 gram dengan hasil rendemen 6,97% (b/b), perhitungan rendemen ekstrak dapat dilihat pada Lampiran B. Hasil ekstrak kulit buah naga merah disimpan di dalam lemari es apabila tidak langsung digunakan.



(a)



(b)



(c)



(d)

(a) Penyaringan hasil maserasi; (b) Evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*; (c) Evaporasi dengan cara *waterbath*; (d) Hasil ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 100%

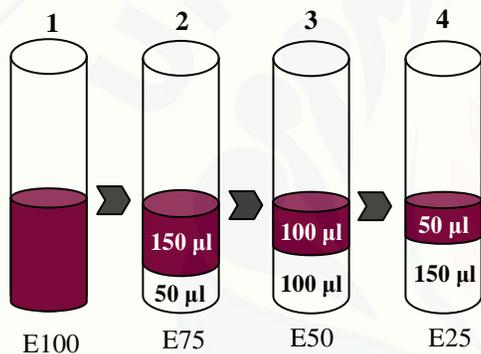
Gambar 3.6 Filtrasi dan evaporasi ekstrak kulit buah naga merah

c. Pengenceran Ekstrak Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)

Pengenceran dilakukan dengan menggunakan aquades steril untuk mendapatkan konsentrasi 75%, 50%, dan 25% dari ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 100%. Pengenceran konsentrasi ekstrak ini dilakukan di dalam *laminar flow* menggunakan mikropipet yang diberi tip dan hasil pengenceran tersebut dimasukkan

pada tabung reaksi (Gambar 3.7). Pengenceran ekstrak etanol kulit buah naga merah menggunakan rumus pengenceran (Lampiran C) adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak 100% diambil sebanyak 200 μl .
2. Ekstrak 75% diperoleh dari 150 μl ekstrak 100% ditambah dengan 50 μl aquades steril lalu dihomogenkan dengan menggunakan *thermolyne*.
3. Ekstrak 50% diperoleh dari 100 μl ekstrak 100% ditambah dengan 100 μl aquades steril lalu dihomogenkan dengan menggunakan *thermolyne*.
4. Ekstrak 25% diperoleh dari 50 μl ekstrak 100% ditambah dengan 150 μl aquades steril lalu dihomogenkan dengan menggunakan *thermolyne*.



Keterangan :

 : Ekstrak kulit buah naga merah

 : Aquades steril

(a)



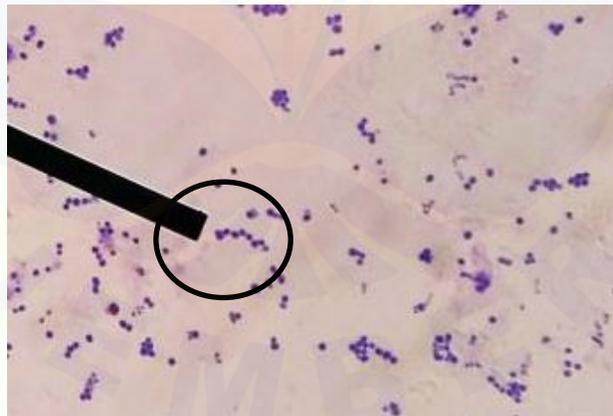
(b)

Gambar 3.7 (a) Alur proses pengenceran ekstrak kulit buah naga merah; (b) Ekstrak kulit buah naga merah yang sudah diencerkan

d. Pewarnaan Gram bakteri *S. mutans*

Pewarnaan gram isolat bakteri *S. mutans* yang berasal dari BBLK Surabaya (Lampiran G.2) dilakukan di laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember untuk memastikan bahwa bakteri tersebut benar bakteri *S. mutans*, tidak terkontaminasi dan siap digunakan untuk penelitian. Tahap pewarnaan gram dimulai

dengan cara meletakkan 1 ose biakan bakteri yang akan diperiksa pada *object glass* yang sudah bersih dan sudah ditetesi dengan 1-2 tetes larutan PZ, kemudian campur biakan dengan gerakan memutar dan sediaan difiksasi di atas api bunsen. Kemudian, pada sediaan dituangkan zat warna *carbol gentian violet* (I) selama 60 detik. *Carbol gentian violet* dibuang dengan cara disiram menggunakan air mengalir dan dituangi larutan *lugol* selama 60 detik. Selanjutnya, *lugol* dibilas dengan air mengalir dan sediaan dilunturkan dengan alkohol 96% selama 15 detik. Untuk menghilangkan sisa bahan peluntur yang mungkin masih tertinggal, maka sediaan kembali dibilas dengan air. Kemudian sediaan diwarnai dengan *safranin* (II) selama 60 detik, lalu sediaan dibilas dengan air untuk menghilangkan sisa-sisa zat warna dan dikeringkan. Setelah kering, sediaan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000X dengan ditutup menggunakan *deck glass* dan diberi minyak emersi (Gunadi *et al.*, 2012:22). Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa biakan bakteri adalah benar *S. mutans* (Lampiran G3). Bakteri *S. mutans* tampak berwarna biru keunguan di bawah mikroskop, serta berbentuk bulat dan berderet memanjang seperti rantai (Gambar 3.8).



Gambar 3.8 Morfologi *S. mutans* dengan perbesaran 1000X

e. Persiapan Media Cair *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B)

Media BHI-B dibuat dengan mencampur 3,7 gram BHI-B dan aquades steril sebanyak 100 ml kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan di atas kompor

(Neogen, 2010). Campuran tersebut kemudian disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Hadioetomo, 1993:51). Media BHI-B kemudian di inkubasi selama 24 jam. Media BHI-B yang steril akan tetap berwarna jernih dan tidak muncul kekeruhan setelah diinkubasi.

f. Persiapan Suspensi Bakteri *S. mutans*

Suspensi *S. mutans* dibuat dengan cara menambahkan 1 ose isolat *S. mutans* ke dalam tabung reaksi yang berisi media cair BHI-B sebanyak 2 ml. Kemudian tabung reaksi tersebut ditutup dengan kapas lalu dimasukkan ke dalam *desicator* dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam (Rahim dan Khan, 2006). Pertumbuhan *S. mutans* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media. Setelah 24 jam, suspensi *S. mutans* dalam tabung reaksi divibrasi dengan menggunakan *thermolyne* dan diukur absorbansinya dengan standar Mc Farland 0,5 dengan absorbansi 0,05 dan panjang gelombang 560 nm dengan menggunakan spektrofotometer (Nwadinigwe dan Onyeidu, 2012).

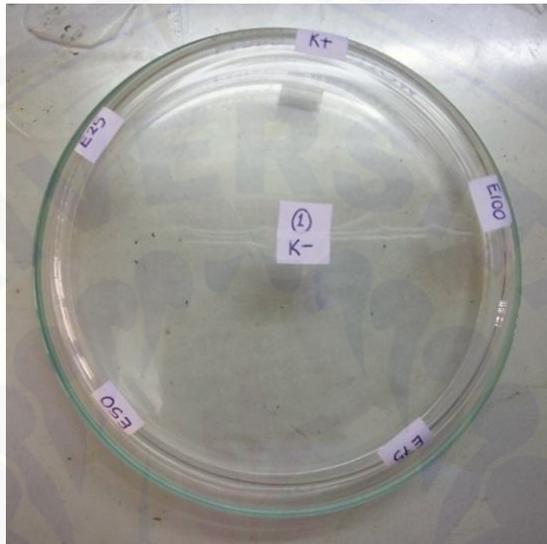
g. Pembuatan Media *Brain Heart Infusion Agar* (BHI-A)

Pembuatan media BHI-A dilakukan dengan mencampur 10,4 gram BHI-A dan 200 ml aquades steril ke dalam tabung *erlenmeyer*. Campuran tersebut diaduk dan dipanaskan diatas kompor sampai homogen. Media agar tersebut kemudian ditutup kapas dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Hadioetomo, 1993:51). Media BHI-A kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk uji sterilisasi. Media BHI-A yang steril akan tetap jernih.

h. Pemberian Kode Label pada *Petridish*

Pemberian kode label pada 8 *petridish* yang steril dilakukan dalam *laminar flow* untuk mencegah kontaminasi dengan lingkungan luar. Untuk membedakan 8 *petridish*, maka pada bagian tengah masing-masing *petridish* diberi kode label nomor urut *petridish* dari 1 sampai 8. Pada bagian bawah masing-masing *petridish*, diberi keterangan label yang terdiri dari 6 macam, yakni kode K- untuk kontrol negatif (aquades steril), K+ untuk kontrol positif (*chlorhexidine* 0,2%), E100 untuk ekstrak

kulit buah naga merah dengan konsentrasi 100%, E75 untuk ekstrak dengan konsentrasi 75%, E50 untuk ekstrak dengan konsentrasi 50%, E25 untuk ekstrak dengan konsentrasi 25% (Gambar 3.9).



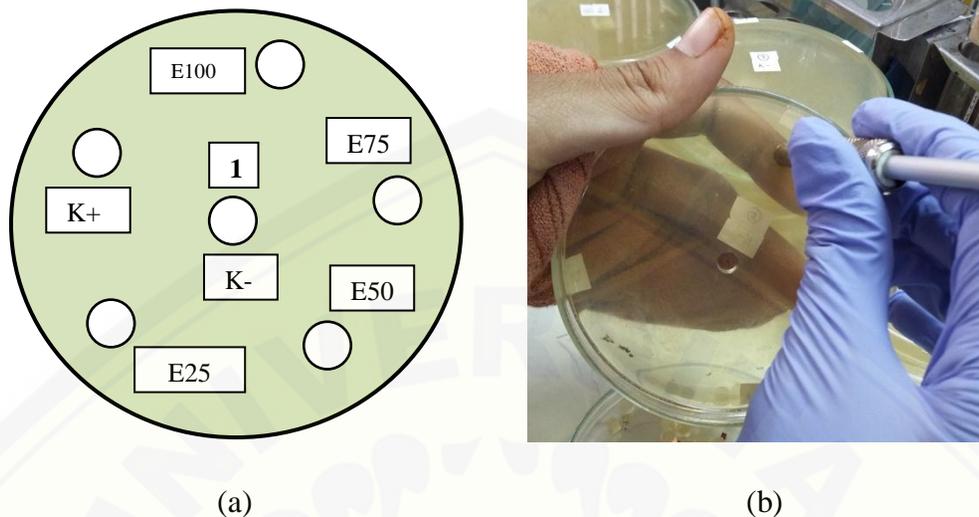
Gambar 3.9 Pemberian kode label pada *petridish*

i. Inokulasi Suspensi *S. mutans* pada Media BHI-A

Ketika media BHI-A sudah hangat, kemudian dituang ke dalam 8 *petridish* steril masing-masing sebanyak 25 ml dengan ketebalan 6 mm (Hadioetomo, 1993:51). Kemudian 0,5 ml suspensi *S. mutans* diinokulasikan pada media BHI-A dan diratakan dengan gigaskrin agar suspensi dalam media menyebar secara merata, kemudian dibiarkan hingga sediaan menjadi padat, kurang lebih 15 menit (Harmita dan Radji, 2008:129).

j. Pembuatan Lubang Sumuran

Pembuatan 6 lubang sumuran dilakukan ketika media yang sudah diinokulasi *S. mutans* memadat, pembuatan lubang sumuran dilakukan dengan menggunakan *borer* yang terbuat dari *stainless steel* dan berdiameter 5 mm (Gambar 3.10).



Gambar 3.10 (a) Lubang sumuran berjumlah 6; (b) Pembuatan lubang sumuran dengan menggunakan *borer*

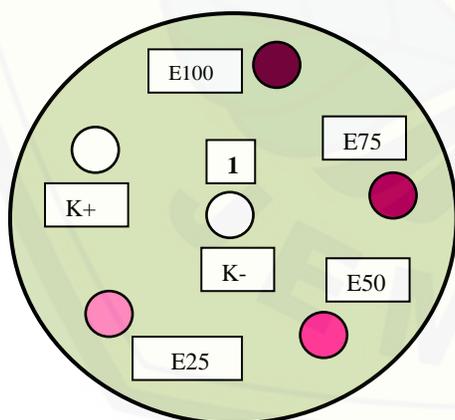
3.8.2 Tahap Perlakuan

Metode pengujian daya hambat yang digunakan adalah metode difusi sumuran. Semua perlakuan dilakukan di dalam *laminar flow* untuk menghindari kontaminasi. Setelah pembuatan 6 lubang sumuran pada 8 *petridish* selesai, dilanjutkan dengan pemberian ekstrak kulit buah naga merah 25%, 50%, 75%, 100%, kontrol positif, dan kontrol negatif pada masing-masing sumuran menggunakan mikropipet yang diberi tip. Tip ini selalu diganti setiap pergantian sampel (Gambar 3.11).

1. Sumuran dengan keterangan label E100 diisi dengan ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 100% sebanyak 20 μL menggunakan mikropipet dengan tip nomor 1. Hal yang sama dilakukan pada *petridish* no 2 hingga nomor 8 menggunakan tip 1.
2. Sumuran dengan keterangan label E75 diisi dengan ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 75% sebanyak 20 μL menggunakan mikropipet dengan tip nomor 2. Hal yang sama dilakukan pada *petridish* no 2 hingga nomor 8 menggunakan tip 2.

3. Sumuran dengan keterangan label E50 diisi dengan ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 50% sebanyak 20 μL menggunakan mikropipet dengan tip nomor 3. Hal yang sama dilakukan pada *petridish* no 2 hingga nomor 8 menggunakan tip 3.
4. Sumuran dengan keterangan label E25 diisi dengan ekstrak kulit buah naga merah konsentrasi 25% sebanyak 20 μL menggunakan mikropipet dengan tip nomor 4. Hal yang sama dilakukan pada *petridish* no 2 hingga nomor 8 menggunakan tip 4.
5. Sumuran dengan keterangan label K+ diisi dengan *chlorhexidine* 0,2% sebanyak 20 μL menggunakan mikropipet dengan tip nomor 5. Hal yang sama dilakukan pada *petridish* no 2 hingga nomor 8 menggunakan tip 5.
6. Sumuran dengan keterangan label K- diisi dengan aquades steril sebanyak 20 μL menggunakan mikropipet dengan tip nomor 6. Hal yang sama dilakukan pada *petridish* no 2 hingga nomor 8 menggunakan tip 6

Delapan *petridish* yang telah diberi perlakuan dimasukkan ke dalam *desicator* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.



(a)



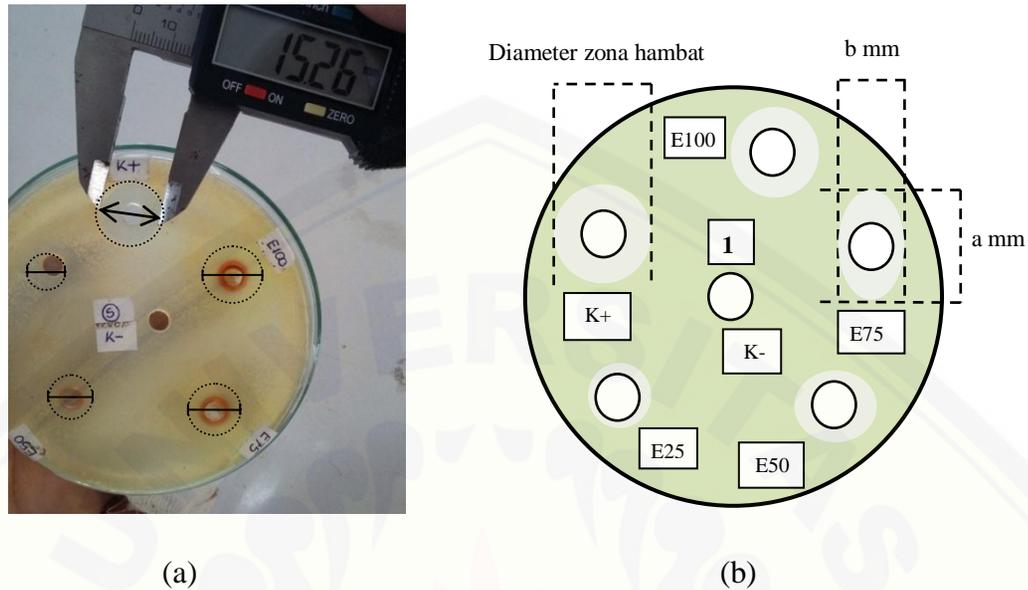
(b)

Gambar 3.11 (a) Pemberian kelompok ekstrak kulit buah naga merah dan kelompok kontrol pada masing-masing lubang sumuran; (b) Pengisian lubang sumuran dengan menggunakan mikropipet dan tip

3.8.3 Tahap Pengukuran Diameter Zona Hambat

Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat di sekitar lubang sumuran pada masing-masing kelompok penelitian dengan menggunakan jangka sorong digital. Pengukuran diameter zona hambat pada *petridish* dilakukan pada posisi terbalik (Alcarno, 1983:168). Diameter zona hambat diukur dari tepi (*break point*) ke tepi (*break point*) zona hambat yang bersebrangan melewati pusat lubang sumuran. Jika tidak terdapat zona hambat di sekitar lubang sumuran, maka dapat dikatakan bahwa nilai diameter zona hambat sebesar 0,00 mm. Jika terdapat zona hambat yang saling tumpang tindih antar kelompok penelitian, maka zona hambat diukur dari pusat lubang sumuran ke tepi zona hambat sehingga didapatkan jari-jari zona hambat, kemudian pengukuran dikalikan dua untuk menentukan diameter zona hambat (Hudzicki, 2009). Jika terdapat zona hambat yang berbentuk lonjong (Gambar 3.12), maka pengukuran dilakukan pada diameter yang panjang (misalnya a mm) dan diameter yang pendek (misalnya b mm), kemudian keduanya dijumlah dan dibagi dua. Jadi diameter zona hambat $x = \frac{(a+b)}{2}$ (Wulandari, 2003:127).

Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali oleh orang yang berbeda dan diambil rata-rata (Hardman, 2001:102). Tiga orang yang melakukan pengukuran, sebelumnya dilakukan penyamaan persepsi dan diberi penjelasan tentang bagaimana cara mengukur zona hambat.

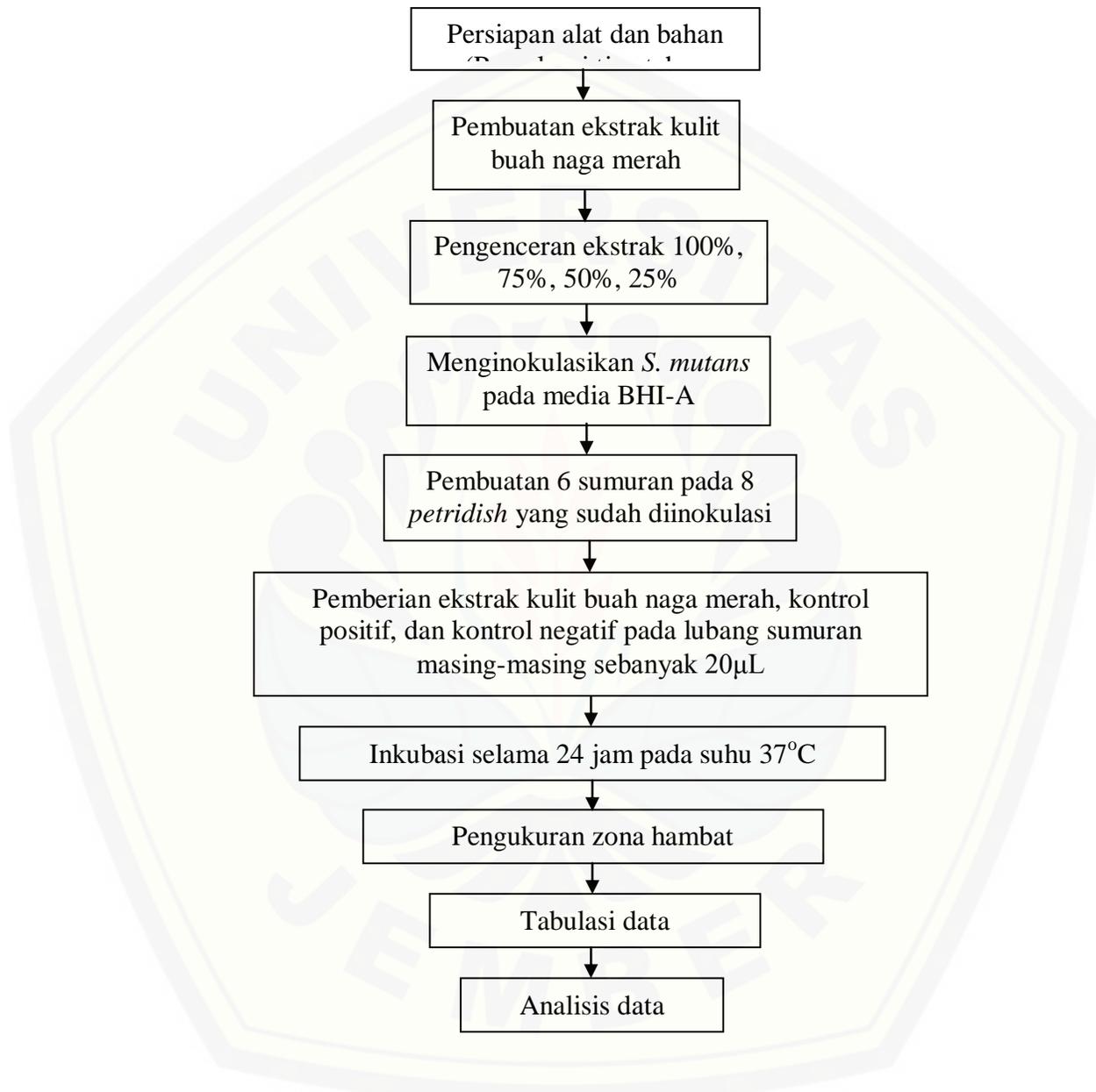


Gambar 3.12 (a) Pengukuran diameter zona hambat menggunakan jangka sorong digital; (b) Pengukuran diameter zona hambat yang berbentuk lonjong

3.9 Analisis Data

Setelah data terkumpul dan disusun dalam bentuk tabel, selanjutnya dilakukan analisa data menggunakan program SPSS. Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Jika pada kedua uji tersebut menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji statistik parametrik, yaitu *Independent One Way ANOVA* dan dilakukan uji lanjut dengan *LSD (Least Square Differences)*. Apabila data tidak terdistribusi normal dan/atau tidak homogen ($p < 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji statistik nonparametrik, yaitu *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna antar kelompok penelitian.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.13 Diagram alur penelitian