

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro* untuk mengetahui apakah ekstrak etanol daun asam memiliki efek antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Metode penelitian yang digunakan adalah metode *dilusi* agar dengan media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) untuk menentukan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan metode *dilusi* tabung dengan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) yang ditujukan untuk mendapatkan nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM). KBM didapat dengan cara menggoreskan hasil *dilusi* tabung pada *plate* berisi BHIA (Noor, 2006; Nurhanafi dkk., 2012).

Isolat bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri *Streptococcus mutans* diidentifikasi terlebih dahulu untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah benar *Streptococcus mutans*. Tes yang dilakukan untuk identifikasi adalah tes pewarnaan Gram, tes *katalase* dan tes *optochin*. Setelah pengecatan Gram, preparat *Streptococcus mutans* diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x. Hasilnya menunjukkan bahwa *Streptococcus mutans* berbentuk kokus yang berantai dan berwarna ungu. Warna ungu tersebut menunjukkan bahwa *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif karena kemampuannya untuk menyerap dan mempertahankan warna kristal violet yang ditetaskan (Pratita, 2012). Hasil tes *katalase* yang didapat adalah negatif, yaitu *Streptococcus mutans* tidak menimbulkan gelembung udara.

Streptococcus tidak memiliki enzim *katalase* sehingga tidak dapat mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 (Prepinida, 2011). Hasil tes *katalase* dikatakan positif apabila tampak gelembung udara. Tes *optochin* digunakan untuk membedakan bakteri *Streptococcus mutans* yang resisten terhadap *optochin* dengan bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang peka terhadap *optochin*. *Streptococcus mutans* menunjukkan reaksi resisten terhadap tes *optochin*, ditandai dengan adanya zona hambat <14 mm di sekeliling disk *optochin*, sedangkan untuk bakteri yang peka terhadap *optochin* akan membentuk zona hambat ≥ 14 mm (Richter *et al.*, 2008). Berdasarkan hasil dari ketiga jenis tes identifikasi ini, dapat dibuktikan bahwa bakteri yang digunakan tersebut adalah benar *Streptococcus mutans*.

Daun asam yang digunakan diperoleh dari Balai Materia Medica, UPT Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur, Kota Batu. Daun asam tersebut kemudian dicuci bersih untuk menghilangkan debu yang menempel, kemudian diangin-anginkan dan dikeringkan dengan panas matahari agar kandungan airnya menguap. Kemudian daun asam digiling halus agar bahan aktif lebih mudah terekstrak. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol 96%. Metode maserasi dipilih karena pengerjaannya lebih mudah dan peralatan yang digunakan sederhana, serta proses maserasi sangat menguntungkan dalam ekstraksi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna (Wullur dkk, 2012). Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut adalah karena sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar, dan non polar, serta kemampuannya

untuk menghambat kerja enzim sehingga dapat terhindar dari hidrolisis dan oksidasi (Arifin dkk, 2006).

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, maka konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10%, 8%, 6%, 4%, dan 2%. Rentang antara konsentrasi yang digunakan adalah sebanyak 2% dengan tujuan meminimalkan kesalahan dalam pengukuran ekstrak. Apabila dipilih rentang ekstrak yang terlalu kecil, dikhawatirkan efek ekstrak yang terlihat akan tidak terlalu berbeda (Primivanny, 2013).

Nilai KHM ekstrak etanol daun asam terhadap *Streptococcus mutans* adalah konsentrasi 4% dan nilai KBM adalah konsentrasi 10%. Kemampuan ekstrak etanol daun asam dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh *Streptococcus mutans* diperkirakan oleh karena zat-zat aktif yang terkandung di dalamnya, yaitu *flavonoid*, *tanin*, *saponin*, dan *alkaloid* (Mun'im, 2009). *Flavonoid* bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang dapat menyebabkan aktifitas metabolisme sel bakteri berhenti karena semua aktifitas metabolisme sel bakteri dikatalisis oleh suatu enzim yang merupakan protein. Berhentinya aktifitas metabolisme ini akan mengakibatkan kematian sel bakteri. *Flavonoid* mampu membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler sehingga mengganggu integritas membran sel bakteri. *Flavonoid* juga mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri (Mutmainnah, 2012; Rosilawati dkk., 2010). *Tanin* diduga dapat mengerutkan dinding sel dan membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel. *Tanin* mampu mendestruksi dan menginaktivasi fungsi materi genetik sehingga sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Juliantina dkk, 2009). *Saponin* dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga

mengubah struktur dan fungsi membran, menyebabkan denaturasi protein membran sehingga membran sel akan rusak dan lisis (Rosilawati dkk., 2010). *Alkaloid* memiliki kemampuan sebagai antibakteri yang mekanismenya diduga dengan cara mengganggu komponen penyusun *peptidoglycan* pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Mutmainnah, 2012).

Berdasarkan hasil penelitian, yaitu adanya penurunan jumlah koloni *Streptococcus mutans* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun asam sehingga diperoleh nilai KHM dan KBM, kemudian diperkuat dengan hasil analisis statistik yang mempunyai nilai kemaknaan yang tinggi dan data mengenai kandungan bahan aktif ekstrak etanol daun asam yang mampu menghambat pertumbuhan/membunuh *Streptococcus mutans*, maka dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun asam memiliki efek antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Hal ini menunjukkan bahwa hipotesis penelitian yang telah disusun dapat diterima.

Keterbatasan yang ditemui dalam penelitian ini antara lain adalah metode pembuatan ekstrak yang digunakan (maserasi) tidak dapat menunjukkan proporsi jumlah bahan aktif yang terkandung di dalam ekstrak tersebut. Lama penyimpanan ekstrak dapat mempengaruhi sensitivitas ekstrak sebagai antibakteri. Semakin lama ekstrak disimpan, sensitivitas ekstrak biasanya akan menurun (Sagala, 2013). Berdasarkan keterbatasan yang telah disebutkan, perlu dilakukan standarisasi dalam pemilihan bahan yang digunakan (daun asam), alat ekstraksi, serta lamanya masa simpan (jangka waktu penyimpanan ekstrak yang masih dapat digunakan sebagai antibakteri) sehingga apabila dilakukan penelitian yang sama di tempat yang berbeda akan didapatkan hasil yang sama.

Aplikasi klinis yang memungkinkan dari penelitian ini adalah penggunaan ekstrak etanol daun asam secara oral dalam bentuk zat herbal yang terkandung dalam pasta gigi untuk pencegahan karies gigi akibat infeksi *Streptococcus mutans*. Berdasarkan hasil penelitian ini, efektivitas antibakteri ekstrak etanol daun asam terhadap *Streptococcus mutans* secara *in vitro* sudah terbukti, namun penggunaan secara klinis masih memerlukan penelitian lebih lanjut melalui pengujian pada hewan coba maupun pengujian pada manusia. Pengujian tersebut bertujuan untuk mengetahui dosis efektif, toksisitas dan efek samping yang mungkin ditimbulkan terhadap tubuh manusia (Primivanny, 2013), sehingga ekstrak etanol daun asam diharapkan dapat menjadi alternatif pencegahan karies gigi yang murah, efektif dan minimum efek samping.

