

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek antimikroba dari ekstrak biji pinang (*Areca catechu Linn*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode dilusi agar untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) karena pada saat menggunakan metode dilusi tabung, semua tabung yang berisi konsentrasi ekstrak tampak lebih keruh daripada kontrol kuman, sehingga tidak dapat diamati (Larasati dkk., 2011). Penentuan KHM dilakukan dengan membandingkan pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans* yang diinokulasikan pada medium agar pada temperatur 37°C selama 18-20 jam.

Bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bakteri yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang. Sebelum dilakukan penelitian, bakteri terlebih dahulu diidentifikasi untuk mengetahui bentuk bakteri tersebut. Identifikasi dilakukan dengan 2 macam cara. Cara yang pertama, dengan melakukan pewarnaan gram, pengecatan gram yang menunjukkan warna ungu (yang menunjukkan bakteri gram positif) karena kemampuan untuk menyerap dan mempertahankan warna kristal violet yang ditetaskan (Dzen, 2006). Morfologi bakteri berbentuk kokus yang berantai. Kemudian tes katalase di mana *Streptococcus mutans* tidak menimbulkan gelembung udara yang menunjukkan tidak adanya reaksi dengan hidrogen peroksida. Bila hasil katalase positif, yaitu tampak gelembung udara, maka bakteri tersebut merupakan jenis *Staphylococcus*.

Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak biji pinang dengan variasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 1 kelompok kontrol tanpa diberi ekstrak biji pinang (konsentrasi 0%).

Ekstrak biji pinang yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dengan teknik maserasi yang menggunakan pelarut etanol. Etanol dapat menyebabkan bertambahnya kandungan flavonoid pada ekstrak biji pinang, sehingga efek antibakteri pada ekstrak juga bertambah. Setelah teknik maserasi, untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak coklat murni dilakukan teknik rotavapor. Ekstrak biji pinang yang sudah jadi berwarna coklat, teksturnya kental, merupakan ekstrak kasar, sehingga ketika dilakukan eksplorasi untuk mencari konsentrasi ekstrak yang efektif menggunakan dilusi tabung didapatkan hasil dilusi tabung yang memiliki endapan. Endapan tersebut menyebabkan derajat kekeruhannya tidak dapat ditentukan. Untuk itu, agar dapat menentukan KHM dari ekstrak biji buah pinang selanjutnya, digunakan metode dilusi agar.

Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diidentifikasi dengan pewarnaan gram, dikultur dalam media BHI *broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan kemudian di standarisasi menggunakan spektrofotometer untuk mendapatkan jumlah koloni sebesar 10<sup>8</sup>CFU/ml.

Dalam menentukan KHM, nilai yang diamati adalah jumlah pertumbuhan koloni bakteri pada medium agar yang telah ditetaskan 10<sup>6</sup>bakteri/10µl bakteri *Streptococcus mutans* dan diinkubasikan selama 18-24 jam. Koloni yang tumbuh berupa spot atau titik tetesan yang berdiameter 6-7 mm. Nilai KHM didefinisikan sebagai konsentrasi ekstrak terendah dimana tidak ada pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Dari hasil pengamatan didapatkan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi ekstrak biji pinang 1,5%. Pada

konsentrasi yang lebih rendah didapatkan pertumbuhan bakteri yang semakin banyak atau lapisan koloni bakteri yang semakin tebal. Hal ini didukung dengan uji statistik *Kruskall Wallis* ( $p < 0.05$ ) yang menyatakan bahwa memang ada perbedaan yang signifikan pada setiap konsentrasi. Pernyataan ini diperkuat dengan adanya hasil uji korelasi spearman yang bernilai negatif (-0,941) yang menunjukkan bahwa adanya hubungan yang negatif antara konsentrasi ekstrak biji pinang dengan pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Hubungan negatif ini artinya, jika semakin tinggi konsentrasi ekstrak biji pinang, maka pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans* akan semakin rendah.

Biji buah pinang mengandung senyawa bioaktif yaitu flavonoid di antaranya tanin. Biji buah pinang juga mengandung proantosianidin, yaitu suatu tannin terkondensasi yang termasuk dalam golongan flavonoid. *Proantosianidin* mempunyai efek antibakteri, antivirus, antifungal, antikarsinogenik, anti-inflamasi, anti-alergi, dan vasodilatasi (Fine, 2000). Flavonoid mempunyai respon yang baik terhadap infeksi mikroba sehingga mereka efektif menghambat pertumbuhan mikroba secara *in vitro* terhadap sejumlah mikroorganisme. Aktivitas antimikroba flavonoid disebabkan oleh kemampuan untuk mengikat adhesin, membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler yang dapat larut, dan juga membentuk kompleks dengan dinding sel mikroba. Flavonoid yang bersifat lipofilik juga mungkin dapat merusak membran mikroba (Cowan, 2000).

Tanin sebagai polifenol antimikrobal memiliki aktifitas antimikroba melalui penghambatan enzim mikroorganisme yaitu pada enzim sitosolik thiolase. Terhambatnya enzim thiolase menyebabkan tidak terjadinya proses oksidasi gugus sulfhidril. Proses oksidasi gugus sulfhidril berperan dalam pembentukan ikatan disulfida pada struktur sekunder protein. Jika ikatan disulfida

tidak terbentuk, maka struktur sekunder protein akan rusak dan menyebabkan denaturasi protein bakteri. Polifenol juga merupakan senyawa lipofilik yang dapat merusak membran sel bakteri. Kerusakan membran sel bakteri ini berakibat kematian terhadap sel bakteri karena apabila membran sel rusak, maka nutrisi penting yang diperlukan bakteri untuk pembentukan energi tidak dapat masuk. Akibatnya, bakteri akan mati karena tidak memiliki energi (Cowan, 1999).

Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanisme yang diperkirakan adalah sebagai berikut : toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan suatu kompleks ikatan tannin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. Tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah, 2004). Tanin juga mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik (Masduki, 1996). Efek antibakteri tannin antara lain melalui: reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik.

Dari hasil penelitian dapat ditentukan KHM ekstrak biji pinang terhadap *Streptococcus mutans* serta diperkuat dengan hasil analisis statistik non parametrik yang mempunyai nilai kemaknaan yang tinggi, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji pinang terbukti mempunyai daya antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Bila dihubungkan dengan hipotesis yang telah disusun sebelumnya, yaitu ekstrak biji pinang dapat mempengaruhi aktivitas

pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*, maka hipotesis dapat diterima dan benar adanya.

Aplikasi klinis ekstrak biji pinang sebagai antimikroba masih memerlukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo*, walaupun secara *in vitro* efeknya sudah terbukti. Hal ini dikarenakan secara medis belum ada penelitian mengenai dosis efektif, toksisitas dan efek samping yang mungkin ditimbulkan ekstrak biji pinang terhadap tubuh manusia. Dari sini perlu dilakukan penelitian *in vivo* terhadap hal-hal yang belum diketahui dari efek ekstrak biji pinang yang dilakukan pada hewan coba terlebih dahulu yang kemudian dapat diaplikasikan pada manusia sehingga diharapkan dapat menjadi alternatif preventif karies gigi yang murah, efektif dan minim efek samping.

