

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol dari kismis (*Vitis vinifera L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans* secara *in vitro*. Metode ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi sokhlet. Metode sokhlet ini dipilih karena pelarut yang digunakan lebih sedikit (efisiensi bahan) dan larutan sari yang dialirkan melalui sifon tetap tinggal dalam labu, sehingga pelarut yang digunakan untuk mengekstrak sampel selalu baru dan meningkatkan laju ekstraksi. Waktu yang digunakan lebih cepat. Ekstrak hasil sokhletasi tidak perlu di filtrasi. Kerugian metode ini adalah pelarut yang digunakan harus mudah menguap (Handa, 2008). Pada penelitian pendahuluan dengan konsentrasi 100% tidak didapati pertumbuhan bakteri sedangkan di konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% 1,576% didapati pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu dilakukan lagi penyempitan dosis dengan rentang 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, dan 60%. Pada penyempitan kedua ini didapati pada semua konsentrasi bakteri tumbuh kecuali di konsentrasi 60%. Karena masih dimungkinkan untuk melakukan penyempitan maka penyempitan kembali dilakukan, kali ini menggunakan jarak antar konsentrasi 2,5%, dimulai dengan konsentrasi 47,5% dan berlanjut sampai mencapai konsentrasi 60% dengan 1 kelompok kontrol yang tidak diberi ekstrak (0%). Walaupun jarak antar konsentrasi yang kecil (2,5%) akan menyebabkan kesalahan pengambilan ekstrak meningkat, hal ini dilakukan agar dapat menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) yang lebih tepat serta mendapatkan persamaan regresi yang lebih teliti. Berapapun jarak antar

konsentrasinya, hal yang perlu ditekankan adalah mencari bukti adanya *dose-effect relationship* antara konsentrasi ekstrak etanol kismis dengan pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

Untuk menentukan KHM digunakan metode dilusi tabung. Hasil uji dilusi tabung menunjukkan bahwa semua tabung dengan konsentrasi tersebut keruh sehingga tidak dapat diamati secara visual KHM-nya. Hal tersebut terjadi karena ekstrak etanol kismis (*Vitis vinifera*) berwarna coklat kehitaman tanpa disertai endapan yang menandakan bahwa campuran ekstrak, aquadest, dan *Brain Heart Infusion Broth* sudah homogen. Dengan demikian KHM ekstrak etanol kismis tidak dapat ditentukan dengan metode dilusi tabung. Hal ini merupakan salah satu kelemahan dari penelitian ini sehingga seharusnya diperlukan metode tambahan seperti metode dilusi agar sehingga KHM tetap dapat diamati. Namun demikian dengan melihat tabel 5.1. dan gambar 5.6. pada konsentrasi 52,5% dan 55% terjadi penurunan pertumbuhan bakteri yang signifikan pada tiap *plate*, sehingga konsentrasi tersebut diduga merupakan KHM-nya.

KBM ditentukan dengan *streaking* masing-masing konsentrasi pada media BHIA yang kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Dari hasil penghitungan koloni yang tumbuh didapatkan KBM dari ekstrak etanol kismis adalah konsentrasi 60%.

Uji regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan kemampuan penghambatan terhadap koloni *S. mutans*. Koefisien korelasi *R square* (r^2) atau koefisien determinasi sebesar 0,982 menyatakan besarnya derajat keeratan hubungan ekstrak etanol kismis dengan jumlah koloni *S. mutans*. Angka 0,982 berarti bahwa jumlah pertumbuhan koloni *S. mutans* yang mampu dipengaruhi penurunannya oleh

ekstrak etanol kismis sebesar 98,2% sedangkan sisanya sebesar 1,8% disebabkan oleh faktor-faktor lain yang tidak diteliti (Dahlan, 2006).

Menurut hasil uji statistika di atas dapat disimpulkan bahwa kismis memang mempunyai aktifitas antimikroba terhadap bakteri *S. mutans* karena bahan ini mempunyai beberapa bahan aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri seperti fenol (dalam bentuk tannin dan flavonoid) dan triterpenoid (dalam bentuk asam *Oleanolic* dan asam *Ursolic*).

Dalam hal ini tannin mempunyai beberapa mekanisme anti mikroba yaitu : astrigent dari tannin mampu menginhibisi beberapa enzim yang dihasilkan atau dibutuhkan oleh mikroba, toksisitas tannin mungkin dipengaruhi oleh aksinya pada membran mikroba, kompleksasi ion besi dari tannin juga dipercaya mempengaruhi toksisitasnya pada mikroba. Daya antibakteri tannin disebabkan oleh adanya gugus pirogalol dan gugus galoil yang merupakan gugus fenol yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau membunuhnya dengan cara bereaksi dengan sel protein dari bakteri sehingga terjadi denaturasi protein. Adanya denaturasi protein pada dinding sel bakteri menyebabkan gangguan metabolisme bakteri sehingga terjadi kerusakan pada dinding sel yang akhirnya menyebabkan sel lisis (Mc Kane and Kandel, 1996). Selain itu, tannin juga menghambat aktivitas glikolisis dan *glucosyltransferase* (GTase) sehingga pembentukan plak menjadi terhambat (Scalbert, 1991). Zat Tannin yang terdapat dalam ekstrak kismis adalah gallic acid.

Mekanisme antimikroba pada flavonoid mungkin berhubungan dengan kemampuannya untuk menempel pada dinding sel bakteri. Senyawa flavonoid yang lipofilik dapat dengan mudah bersatu dengan dinding sel bakteri dan mengganggu membran bakteri tersebut sehingga bakteri menjadi lisis dan mati

(Cowan, 1999). Senyawa flavonoid pada anggur adalah senyawa *catechin* dan *epicatechin*.

Catechin dapat bergabung dengan membran *peptidoglycan* pada dinding sel dan menginduksi presipitasi pada bakteri. Hal ini menyebabkan rusaknya dinding sel dan terganggunya biosintesis pada bakteri yang akhirnya menyebabkan bakteri mati (Shimamura *et al*, 2007).

Dalam kismis juga ditemukan senyawa triterpenoid dalam bentuk *oleanolic* dan *ursolic acid*. Mekanisme kerja terpenoid sebagai antimikroba belum sepenuhnya dipahami, tetapi beberapa penelitian menemukan adanya efek toksik terpenoid terhadap struktur dan fungsi membran. Bagian lipofilik pada terpenoid berpartisipasi ke dalam struktur dan fungsi membran sehingga menyebabkan perubahan fluiditas membran, mengubah lingkungan lipid protein membran, melisiskan membran sel, dan mengganggu aktivitas enzimatik membran yang dapat menghambat pembentukan dinding sel (Niescier, 2000; Choi *et al*, 2008). Terpenoid juga mempunyai fungsi menghambat sintesa enzim *glucosyltransferase* sehingga pembentukan dextran terganggu dan pasokan makanan bakteri terhambat sehingga lama kelamaan bakteri akan mati (Wu, 2008). Pada penelitian yang lain (Kurek *et al*, 2009) terpenoid terutama senyawa Asam Ursolik dan Asam *Oleanolic* juga diketahui mempunyai efek pada metabolisme *peptidoglycan* pada bakteri *Listeria monocytogenes* serta dapat menghambat pertumbuhannya. Kedua senyawa tersebut terbukti meningkatkan tingkat autolisis dari bakteri *Listeria monocytogenes* serta mempengaruhi bentuk selnya. Senyawa Asam *Ursolic* dan *Oleanolic* juga diketahui mempunyai efek antimikroba terhadap berbagai patogen mulut. Senyawa asam *Ursolic* dan *Oleanolic* yang diperoleh dari hasil pemurnian ekstrak kismis mempunyai

rentang KHM 3,5 sampai 488 $\mu\text{g/ml}$ terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan 7,8 sampai 625 $\mu\text{g/ml}$ terhadap *S. mutans* (Rivero-Cruz *et al*, 2008).

Berdasarkan hasil analisis data dan pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kismis mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Streptococcus mutans* secara *in-vitro* melalui zat *tannin*, *flavonoid* (*catechin*), dan *triterpenoid* (*Ursolic* dan *Oleanolic acid*) yang dapat merusak membran sel dari bakteri tersebut dan menghambat metabolisme bakteri dengan menghambat aktifitas enzim *glucosyltransferase* (GTF). Adanya penurunan jumlah konsentrasi bakteri yang tumbuh seiring dengan penambahan konsentrasi ekstrak membuktikan adanya efek menghambat dan menurunkan daya tumbuh serta efek membunuh bakteri. Kesimpulan ini sesuai dengan hipotesis awal dari penulis dan dapat dibuktikan dengan adanya signifikansi yang ditunjukkan dengan hasil analisis statistik. Hal ini dapat membuktikan bahwa kismis merupakan makanan yang tingkat resiko kariesnya rendah karena kismis dapat menurunkan dan membunuh bakteri penyebab karies *Streptococcus mutans* secara *in-vitro*. Walaupun demikian penelitian lanjutan secara *in-vivo* tetap perlu diadakan sebagai sarana untuk mengetahui seberapa efektifkah kismis mengendalikan jumlah bakteri penyebab karies khususnya *Streptococcus mutans* dalam rongga mulut manusia