

ORIGINAL ARTICLE

Antibacterial Effect of *Granati fructus* Cortex Extract on *Streptococcus mutans* In Vitro

Cut R. Alfath¹, Vera Yulina¹, Sunnati²

¹Undergraduate Program, Dentistry Study Program, Faculty of Medicine, University of Syiah Kuala, Banda Aceh 23111, Indonesia

²Dentistry Study Program, Faculty of Medicine, University of Syiah Kuala, Banda Aceh 23111, Indonesia
Correspondence e-mail to: vera.canina28@gmail.com

ABSTRACT

The rind of pomegranate fruit (*Granati fructus* cortex) composed of antibacterial compounds such as alkaloid, flavonoid and tannin. **Objective:** To evaluate the bacterial effect of *Granati fructus* cortex extract against *Streptococcus mutans*. **Methods:** The study was laboratory experimental. The inhibition test was performed by agar diffusion method on MHA medium. **Results:** It showed the bacterial property of *Granati fructus* cortex on various concentration. The highest extract concentration of 30% extract has the largest of inhibition zones (15.4mm). The results showed a difference in the size of inhibition zones related to different extract concentrations. **Conclusion:** This study confirmed the antibacterial effect of *Granati fructus* cortex on the growth of *Streptococcus mutans*.

ABSTRAK

Efek antibakteri ekstrak kulit buah delima (*Granati fructus cortex*) pada *Streptococcus mutans* in vitro. *Granati fructus cortex* mengandung senyawa-senyawa antibakteri seperti alkaloid, flavonoid, dan tannin. **Tujuan:** Mengevaluasi efek antibakteri *Granati fructus cortex* dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. **Metode:** Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris yang menguji daya hambat antibakteri menggunakan metode difusi agar dengan media MHA. **Hasil:** Ekstrak kulit buah delima dalam berbagai konsentrasi memiliki efek antibakteri, ekstrak kulit buah delima dengan konsentrasi 30% memiliki rata-rata zona hambat paling besar (15,4mm). Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit buah delima maka semakin besar zona hambat yang terbentuk. Hasil uji ini juga menunjukkan adanya perbedaan rata-rata zona hambat dalam berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah delima. **Simpulan:** *Granati fructus cortex* memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

Key words: antibacterial effect, *Granati fructus cortex*, *Streptococcus mutans*

PENDAHULUAN

Streptococcus mutans (*S. mutans*) adalah bakteri Gram positif yang dapat memetabolisme karbohidrat terutama sukrosa dan menciptakan suasana asam di rongga mulut.¹ *S. mutans* mempunyai dua sistem enzim pada dinding sel yang dapat membentuk dua polisakarida ekstraseluler dari sukrosa.² Sukrosa dihidrolisis menjadi fruktosa (levan) dan glukosa (dekstran). Fruktosa dihidrolisis oleh enzim fruktosiltransferase dan glukosa dihidrolisis oleh enzim glukosiltransferase.^{1,2} Fermentasi sukrosa akan menghasilkan penurunan pH saliva menjadi 5,0 atau lebih rendah. Ketika pH plak turun di bawah 5,0, dapat saliva terganggu dan menyebabkan pelepasan ion kalsium dan fosfat dari kristal hidroksiapatit.³

Demineralisasi email dapat terjadi karena peningkatan konsentrasi asam laktat sehingga dapat saliva tidak cukup untuk mencegah larutnya email, selanjutnya proses karies dapat terjadi.^{1,3} *S. mutans* merupakan bakteri penyebab awal terjadinya karies karena adanya variasi faktor-faktor virulensi yang khas pada bakteri yang telah diisolasi.³ *S. mutans* merupakan bakteri anaerob yang dikenal memproduksi asam laktat sebagai bagian dari metabolismenya dan mampu melekat pada permukaan gigi dengan adanya sukrosa sebagai substrat.^{3,4}

Dalam dekade terakhir ini banyak penelitian yang ditujukan untuk pengembangan tumbuhan sebagai sumber bahan obat. Untuk memenuhi keperluan perawatan kesehatan dasar, diperkirakan sekitar 75%-

80% penduduk desa di dunia menggunakan bahan obat yang berasal dari tumbuhan, dan sekitar 28% dari tumbuhan di bumi telah dipakai sebagai bahan obat tradisional.⁵ Rumusan obat-obat nasional menyebutkan kurang lebih 23 negara menggunakan delima sebagai obat resmi.⁶ Di Indonesia ada dua macam delima yang sering ditanam, yaitu delima merah dan putih. Delima putih sangat kaya akan kandungan alkaloid dan flavonoid. Kulit buah, kulit akar dan kulit batang delima mempunyai khasiat sebagai obat sakit gigi. Air rebusan buah dan kulit buah delima dapat dipakai sebagai obat kumur secara tradisional.

Kulit buah delima mempunyai kandungan kalium yang tinggi, selain mineral-mineral seperti fosfor, kalsium, besi, natrium, dan vitamin-vitamin seperti vitamin A, B1, B2, B3, dan C. Kalium bersama natrium, mengatur keseimbangan air di dalam tubuh dan menjaga detak jantung agar tetap normal. Kulit buah delima putih memiliki sifat antibakteri terhadap beberapa bakteri di rongga mulut.⁵ Kulit buah delima mengandung senyawa alkaloid *pelletierene*, *granatin*, *betulic acid*, *ursolic acid*, *isoquercitrin*, *elligatanin*, resin, *triterpenoid*, kalsium oksalat, dan pati. Kulit buah delima mengandung alkaloid dan flavonoid yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *S. mutans*.⁷

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak buah delima terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans*, dan mengetahui gambaran daya hambat ekstrak buah delima terhadap bakteri *S. mutans* dalam berbagai konsentrasi (15%, 20%, 25%, dan 30%). Hipotesis penelitian ini adalah ekstrak *Granati fructus cortex* mempunyai daya hambat terhadap *S. mutans* dan akan terdapat perbedaan efek antibakteri beberapa konsentrasi dari ekstrak *Granati fructus cortex* terhadap *S. mutans*.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) dan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.

Bahan-bahan yang digunakan adalah: buah delima 2kg, etanol 95% 2 liter, klorheksidin glukonat 2% (Kimia Farma, Indonesia), *dimethyl sulfoxide* (DMSO), media TYS20B, NaCl 0,85%, alkohol 70%, dan biakan *S. mutans*. Alat-alat yang digunakan adalah: *rotary evaporator*, *disk* kosong (*Oxoid*), inkubator (*Fishers scientific*), oven (*Gallenkamp*, Jerman), kaliper geser (*Tricebrand*, China), pipet volume (*Pyrex*, Japan), ose dan kapas lidi, autoklaf (*Nacro e series model 9000-D*, Germany), cawan petri, lampu spiritus, gelas ukur

(*Pyrex*, Japan), botol *vial*, pinset (*Smic*, Japan), *hot plate* (*Fisons*, UK), Pipet mikro, *pipetman starter kit* (*Gilson*, USA), rak tabung reaksi, spatula, aluminium foil, gelas ukur 500ml (*Pyrex*, Japan), neraca analitik (*Ohaus*), dan tabung reaksi (*Pyrex*, Japan).

Bahan-bahan pembuat media terlebih dahulu ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik. Media TYS yang 20B digunakan: sukrosa 200g, *Yeast Extract* 10g, *Trypticase Soy Agar* 40g, *Bacto Agar* 5g, dan *Bacitrasin* 4mg/0,004g (200 UI). Setelah bahan-bahan tersebut ditimbang, dimasukkan ke dalam tabung *erlenmeyer* dan ditambahkan 1000ml aquades steril. Selanjutnya dilakukan homogenisasi dan dipanaskan di atas *hot plate* hingga mendidih. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah bahan agak dingin, dimasukkan ke dalam cawan petri secara aseptis menggunakan lampu spiritus.

Pembuatan ekstrak etanol buah delima

Buah delima sebanyak 2kg dibersihkan, diambil kulitnya kemudian dikeringkan selama 24 jam pada suhu kamar, dilanjutkan dengan proses maserasi dengan merendam dalam etanol menggunakan botol tertutup berwarna gelap selama 24 jam.

Hasil maserasi disaring kemudian dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* pada suhu tidak lebih dari 50°C, sehingga pelarut etanol terpisah dengan ekstrak tumbuhan. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam botol steril. Konsentrasi ekstrak kulit buah delima sebanyak 15%, 20%, 25%, dan 30%, masing-masing didapat dengan melarutkan ekstrak kulit buah delima dalam larutan DMSO yang merupakan bahan alami dari serat kayu dan tidak berbahaya. Larutan DMSO berfungsi sebagai pelarut yang cepat meresap ke dalam epitel ekstrak tanpa merusak sel-sel tersebut dan sering digunakan dalam bidang kedokteran dan kesehatan. Ekstrak yang telah dilarutkan, kemudian dimasukkan ke dalam botol yang telah steril dan disimpan pada suhu 4°C sampai waktu digunakan.

Pembiakan bakteri *S. mutans*

Bakteri yang digunakan adalah bakteri *S. mutans* dari biakan murni yang terdapat di Laboratorium Biologi FMIPA UNSYIAH. Biakan bakteri dilakukan dalam suasana aerob pada cawan petri berisi media TYS20B dan diinkubasi dalam suasana aerob pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu pertumbuhan *S. mutans* diamati. Apabila pertumbuhan bakteri tidak subur dan terjadi kontaminasi bakteri lain, maka prosedur pembiakan bakteri dan pengamatan diulang kembali. Sebanyak 1-2 ose dari biakan murni bakteri uji, dilarutkan dengan NaCl 0,85% sampai diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml), kemudian disebar pada media MHA.

Uji efektifitas antibakteri metode difusi agar

Cakram kosong diambil dan diletakkan pada piring petri steril dengan menggunakan pinset steril. Empat cakram kosong digunakan untuk masing-masing bahan coba kemudian diteteskan 15µl bahan coba menggunakan pipet mikro dan didiamkan selama 60 menit. Suspensi bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ colony forming units (CFU)/ml diusapkan secara merata menggunakan kapas lidi pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dalam piring petri. Setelah diusapkan, dibiarkan selama 30 menit supaya bakteri meresap ke dalam agar. Setelah persiapan dilakukan, cakram yang ditetesi bahan coba diletakkan pada media MHA mengikut area yang telah dibuat untuk masing-masing bahan coba. Setelah itu, media dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C dan diamati setelah 18 dan 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan kaliper geser. Klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri dilakukan berdasarkan metode yang telah dikembangkan sebelumnya (Tabel 1).⁸

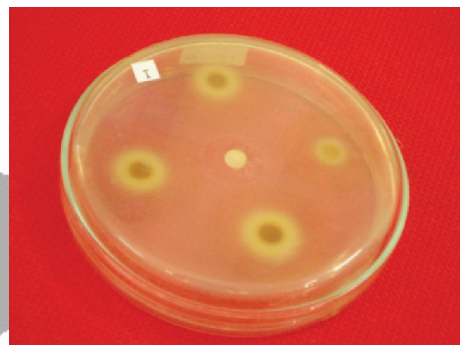
HASIL

Hasil uji daya hambat ekstrak *Granati fructus cortex* terhadap pertumbuhan *S. mutans* pada media MHA menunjukkan terbentuknya zona hambat yang berupa zona terang disekitar kertas cakram dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil pengamatan pada konsentrasi ekstrak kulit buah delima antara konsentrasi 15% dan 25% menunjukkan adanya peningkatan rata-rata diameter zona hambat dari 10,2mm ke 13,6mm. Konsentrasi ekstrak kulit buah delima antara konsentrasi 20% dan 30% juga menunjukkan peningkatan rata-rata diameter zona hambat dari 12,8mm harus diubah ke 15,4mm. Kontrol positif tidak memiliki zona hambat rata-rata paling besar, tetapi ekstrak kulit buah delima dengan konsentrasi 30% memiliki zona hambat rata-rata yang paling besar.

Hasil analisis parametik *one-way ANOVA* memperlihatkan adanya perbedaan rata-rata diameter zona hambat yang bermakna ($p < 0,05$) antara berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah delima dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Uji Games How digunakan untuk melihat perbedaan yang bermakna dari variasi konsentrasi ekstrak kulit buah delima dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Uji ini menunjukkan konsentrasi 15% memiliki perbedaan bermakna dengan konsentrasi 25%, 30%, dan kontrol positif. Konsentrasi 20% tidak memiliki perbedaan bermakna dengan konsentrasi 15%, 25%, 30%, dan kontrol positif. Hasil uji lanjut di atas juga menunjukkan bahwa konsentrasi 30% memang memiliki zona hambat rata-rata yang paling tinggi (15,4mm), akan tetapi tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan kontrol positif yaitu 15,2mm.

Tabel 1. Klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri⁸

Diameter Zona Terang	Respon Hambatan Pertumbuhan
> 20mm	Kuat
16 – 20mm	Sedang
10 – 15mm	Lemah
< 10	Tidak ada



Gambar 1. Zona hambat *S. mutans* pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

DISKUSI

Penelitian ini fokus pada efek anti-bakteri berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah delima terhadap *S. mutans*, agen kausatif utama penyebab karies pada manusia. Kemampuan bakteri ini melekat pada permukaan gigi merupakan hal terpenting bagi perkembangan karies.¹ Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode tes difusi agar. Pengukuran zona hambat dilakukan setelah 18 sampai 24 jam menggunakan jangka geser. Zona hambat merupakan daerah tempat terdapatnya zona bening di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan adanya daya hambat ekstrak kulit buah delima dan klorheksidin glukonat 0,2% sebagai kontrol positif terhadap *S. mutans*.⁸

S. mutans memiliki berbagai faktor virulensi seperti adesi, kolonisasi, dan bersifat asidofilik. Tidak seperti spesies bakteri lain yang terdapat pada plak, metabolisme bakteri menurun pada suasana pH yang rendah, namun metabolisme *S. mutans* meningkat pada pH rendah. Hal ini disebabkan karena sistem daya proton yang digunakan untuk transpor nutrisi dapat menembus dinding selnya pada pH rendah serta kadar glukosa tinggi, dan kandungan ion hidrogen yang meningkat pada keadaan asam. *S. mutans* mampu menurunkan pH rongga mulut dan mempertahankan nilai keasaman yang tidak alami. Kondisi ini menguntungkan metabolisme *S. mutans* dan tidak menguntungkan bagi spesies lain yang hidup pada waktu bersamaan.¹

Pada penelitian ini, ekstrak kulit buah delima dibuat secara sederhana dengan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstraksi maserasi merupakan suatu metode yang sering digunakan untuk mendapatkan senyawa dari tumbuhan

dengan menarik senyawa organik dalam suatu bahan padat menggunakan pelarut organik.⁹ Pelarut yang digunakan adalah etanol 95%. Proses maserasi pada kulit buah delima akan mengeluarkan senyawa-senyawa aktif yang akan diikat oleh pelarut yang digunakan. Penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa kulit buah delima merupakan suatu tanaman alami yang mengandung zat-zat (misalnya alkaloid, flavonoid, dan tanin) yang dipercaya dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans* dan sebagai tanaman antibakteri.¹⁰

Penelitian yang dilakukan sebelumnya mengungkapkan bahwa ekstrak metanol yang terdapat pada kulit buah delima mampu melawan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, dan *Candida albicans*.¹¹ Penelitian tersebut belum menyebutkan bahwa bakteri *S. mutans* dapat dihambat pertumbuhannya oleh kulit buah delima.¹¹ Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah delima mempunyai urutan kelima dalam menghambat *S. mutans* dibandingkan dengan berbagai ekstrak herbal lainnya.¹²

Konsentrasi ekstrak kulit buah delima 15%, 20%, 25%, dan 30% kemudian dibandingkan dengan klorheksidin glukonat 0,2% sebagai kontrol positif. Klorheksidin glukonat merupakan antiseptik bersifat kimia yang banyak digunakan sebagai bahan obat kumur karena sifatnya yang dapat membunuh bakteri Gram positif serta Gram negatif. Klorheksidin bersifat netral dengan pH 5-7 di dalam rongga mulut. Interaksi ini akan mengikat permeabilitas dinding sel bakteri yang menyebabkan terjadinya penetrasi ke dalam sitoplasma. Ion kalium merupakan substansi pertama yang dapat dilihat ketika membran sitoplasma dihancurkan. Perubahan permeabilitas dari membran sitoplasma dapat menyebabkan presipitasi sari protein sitoplasma, perubahan keseimbangan osmosis, gangguan metabolisme, pemisahan sel, hambatan membran ATP, pencegahan proses anaerob, dan kematian mikroorganismenya.

Hasil analisis statistik dengan *one-way* ANOVA memperlihatkan adanya perbedaan rata-rata diameter zona hambat yang bermakna ($p < 0,05$) antara berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah delima dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Hasil penelitian uji daya hambat yang dilakukan pada media padat MHA menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit buah delima maka semakin besar zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Beberapa faktor yang mempengaruhi adanya zona hambat bergantung kepada kemampuan difusi bahan antimikroba ke dalam media dan interaksinya dengan mikroorganismenya yang diuji, jumlah mikroorganismenya yang digunakan, kecepatan tumbuh mikroorganismenya yang diuji, dan sensitivitas mikroorganismenya terhadap bahan antimikroba yang diuji. Bahan pelarut yang digunakan juga memiliki pengaruh terhadap terbentuknya zona hambat di sekitar cakram herbal. Selain itu zat ekstraktif yang

terkandung pada tumbuhan itu sendiri juga memiliki pengaruh pada daya hambat kulit buah delima terhadap pertumbuhan *S. mutans*.¹³

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa sediaan ekstrak kulit buah delima mampu secara efektif menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit buah delima, maka semakin besar zona hambat yang terbentuk terhadap pertumbuhan *S. mutans*. Bahan ini berpotensi sebagai obat alternatif antibakteri rongga mulut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Simon L. The role of *Streptococcus mutans* and oral ecology in formation of dental caries. LURJ [Internet]. 2007 [cited 2012 8 Mar]; Available from: <https://www.uleth.ca/dspace/handle/10133/1196>.
2. Rowson JE, Slaney AE. Dentistry. 1st ed. Delhi, India: AITB, 2001.
3. Roeslan BO. Metabolisme karbohidrat oleh *Streptococcus mutans*: pembentukan plak dan terjadinya karies gigi. Jurnal PDGI. 1992;4: 8-12. Indonesian.
4. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype k in the human oral cavity. J Clin Microbiol. 2004;42:198-202.
5. Farnsworth NR, Soejarto DD. Global importance of medicinal plants. Cambridge Univ Press; 1991.
6. Heyne K. Tumbuhan berguna Indonesia II. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 1987. Indonesian.
7. Samarayanake L. Essential microbiology for dentistry. 3rd ed. Elsevier: Churchill Livingstone; 2006.
8. Greenwood D. Antimicrobial and chemotherapy. Michigan: Oxford University Press; 2000.
9. Nurahyati H. Evaluasi pH ekstrak daun teh (*Camellia sinensis*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Banda Aceh [skripsi] Program Studi Kedokteran Gigi FK Unsyiah, 2010. Indonesian.
10. Jurenka J. Therapeutic Applications of pomegranate (*Punica granatum L*): A review. Alter Med Rev. 2008;13:128-44.
11. Sastracaha G, Yotnuengnit P, Booncong P, Sangtherapitkul P. Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts. A preliminary study. J Int Acad Perio. 2003;5:106-15.
12. Syarif S. Skrining tumbuhan obat yang mempunyai aktifitas antibakteri penyebab karies gigi dan pembentuk plak. J Bahan Alam Ina. 2007;6:65-72. Indonesian.
13. Supriadi A. Sifat antibakteri zat ekstraktif kayu siwak (*Salvadora persicawall*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. [skripsi] Bogor: Fakultas Kehutanan IPB, 2009. Indonesian.