

(Laporan Penelitian)

Efek Ekstrak Daun *Pluchea indica* terhadap Hambatan Pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis*

¹Taufiq Ariwibowo, ²Meiny Faudah Amin, ³Putri Nur Pratiwi

^{1,2}Departemen Konservasi Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia

³Mahasiswa, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti, Jakarta, Indonesia

Email : putrinurpratiwi121@gmail.com

ABSTRACT

Background: *Porphyromonas gingivalis* is one of the bacteria causes primary root canal infections. Bacterial elimination using root canal irrigation agents is important in successful root canal treatment. NaOCl as the gold standard is known to have disadvantages such as irritating periapical tissue. Active compounds in *Pluchea indica* leaves such as flavonoids, tannins and terpenoids possess antibacterial effects. **Objectives:** To determine the effect of *Pluchea indica* leaves extract on *P. gingivalis* growth inhibition. **Method:** This study is an in vitro experimental laboratory of agar well diffusion method used *Pluchea indica* leaves extract in several concentrations (6,25%, 12,5%, 25%, 50% and 100%) and NaOCl 5,25% as a positive control. The sample in this study was *P. gingivalis*. **Result:** This study showed that the diameter of inhibitor zone against *P. gingivalis* was exists on concentration of 50% and 100%, their values are 10,216 mm and 13,023 mm. The positive control showed an average inhibition zone of 12,803 mm. **Conclusion:** *Pluchea indica* leaves extract showed antibacterial effect against *P.gingivalis* at the concentration of 50% and 100%. The 100% concentration had the largest inhibition zone and was equivalent to positive control in inhibiting *P.gingivalis*.

Keywords : Inhibitory zone; *Pluchea indica*; *Porphyromonas gingivalis*

PENDAHULUAN

Mikroba memainkan peranan penting dalam sebagian besar penyakit pulpa dan jaringan periradikular.¹ *P. gingivalis* adalah bakteri Gram negatif anaerob, berpigmen hitam, ditemukan dengan prevalensi 28% dalam pulpa nekrotik dan menjadi salah satu penyebab utama infeksi saluran akar dan berhubungan dengan penyakit periodontal.² Bakteri ini mempunyai faktor virulensi seperti lipopolisakarida (LPS), fimbriae, kapsul, protease, protein dan vesikel membran luar.^{3,4}

Eliminasi bakteri menggunakan bahan irigasi saluran akar penting dalam keberhasilan perawatan saluran akar.⁵ Larutan irigasi yang menjadi standar baku hingga saat ini adalah natrium hipoklorit 5,25% (NaOCl 5,25%) karena memiliki efek antibakteri dan kemampuannya dalam melarutkan jaringan organik, tetapi NaOCl bersifat toksik dan dapat menimbulkan rasa nyeri apabila masuk ke jaringan periapikal. Diperlukan alternatif lain yang terjangkau, tidak toksik dan efektif.

Tanaman beluntas (*Pluchea indica*) adalah tanaman herbal yang banyak tersebar di kawasan Asia, termasuk di Indonesia.⁶ Daun *Pluchea indica* dikenal oleh masyarakat Indonesia karena khasiatnya dalam mengatasi bau badan dan mulut, menambah nafsu makan, meredakan gangguan pencernaan, dan mengatasi sakit rematik. Bagian daun dari tanaman *Pluchea indica* paling sering dimanfaatkan karena mengandung zat aktif seperti tanin, flavonoid, minyak atsiri, dan polifenol yang diketahui mempunyai daya antibakteri.^{7,8}

Hasil penelitian terdahulu menyatakan ekstrak daun *Pluchea indica* mempunyai daya antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, dan

Fusobacterium nucleatum.^{8,9} Penelitian ini ingin menguji efek ekstrak daun *Pluchea indica* terhadap hambatan pertumbuhan *P. gingivalis*.

METODE PENELITIAN

Pengekstrakan daun *Pluchea indica*

Pembuatan ekstrak dimulai dari mencuci 1 kg daun *Pluchea indica* dengan air hingga bersih lalu menggunakan oven daun dikeringkan selama 3 hari, hingga berbentuk simplisia. Kemudian simplisia daun *Pluchea indica* dihaluskan dengan blender hingga didapatkan serbuk halus. Serbuk daun *Pluchea indica* direndam menggunakan etanol 96% lalu diaduk agar homogen, proses maserasi dilakukan pada suhu ruangan, selanjutnya ditutup dengan aluminium foil dan disimpan di suhu 37°C dalam waktu 24 jam, kemudian disaring, dilakukan remaserasi sebanyak 3 kali. Seluruh maserat yang terkumpul akan diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50°C. Hingga akhirnya didapat ekstrak kental yang bebas dari pelarut. Ekstrak kemudian diencerkan dengan DMSO 20% sehingga diperoleh konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%.

Skrining fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mendeteksi kandungan senyawa aktif didalam daun *Pluchea indica*. Uji fitokimia dilaksanakan di pusat kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Skrining alkaloid dilakukan dengan menambahkan pereaksi Bouchardat, Mayer, dan Dragendorf. Tambahkan 2 tetes reagen ke dalam 1 ml filtrat, jika mengandung alkaloid, akan terbentuk endapan coklat hingga hitam pada reagen Bouchardat, terbentuk endapan menggumpal putih pada

reagen Mayer dan terbentuk endapan jingga coklat pada reagen Dragendorf. Jika endapan terbentuk sekurang-kurangnya pada dua golongan reagen percobaan yang digunakan, daun *Pluchea indica* mengandung alkaloid. Skrining flavonoid dilakukan dengan menambahkan 2 ml ekstrak *Pluchea indica* dengan 10 tetes HCl, jika mengandung flavonoid maka akan terbentuk warna merah tua dalam waktu 2-5 menit. Skrining tanin dilakukan dengan menambahkan ekstrak ke dalam 15 mL air panas lalu dipanaskan hingga mendidih, selanjutnya ditetaskan FeCl_3 1%, jika mengandung tanin menghasilkan warna hijau violet. Skrining saponin dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi yang mencampurkan 5 mg ekstrak serta 10 mL air panas, lalu didinginkan sebelum dikocok selama 10 detik, jika mengandung saponin maka akan terbentuk buih dalam tidak kurang dari 10 menit. Skrining terpenoid dilakukan dengan 5 mg ekstrak pekat ditambahkan dengan 3 mL diklorometan lalu diuapkan dengan cawan penguap. 6 tetes asam asetat dan 3 tetes H_2SO_4 pekat ditambahkan ke residu penguapan. Jika mengandung terpenoid menghasilkan warna violet-biru atau merah-hijau

Pembuatan media

Sebanyak 3,7 gram bubuk BHI (Oxoid) dan 2 gram bubuk agar ditimbang dengan neraca analitik (Kern ABJ-NM/ABS-N) kemudian dimasukkan ke labu Erlenmeyer, lalu tambahkan 100 mL akuades lalu aduk hingga homogen. Tutup labu Erlenmeyer dengan aluminium foil lalu sterilkan pada suhu 121°C dengan autoklaf (Tony ES-315) dalam waktu 15 menit. Tunggu hingga suhu turun menjadi 37°C , BHI Agar dituang ke cawan petri dan didiamkan hingga padat.

Kultur bakteri

Biakan murni bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 yang didapat dari laboratorium MiCORE diambil dengan menggunakan mikropipet (Lambda Plus) sebanyak $20\mu\text{L}$ ke dalam *microtube* yang berisi BHI Broth (Sigma-Aldrich) steril lalu suspensi *P. gingivalis* dihomogenkan menggunakan vortex (DLAB MX-S), lalu masukkan ke inkubator (JISICO) dan inkubasi dalam suasana anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya bakteri diencerkan hingga mencapai McFarland 0,5 atau kepadatan bakteri setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Uji daya hambat difusi sumuran

Uji daya hambat bakteri digunakan metode difusi sumuran pada 5 buah cawan petri yang telah berisi BHI Agar. Sebanyak $20\mu\text{L}$ suspensi *Porphyromonas gingivalis* diambil dengan mikropipet dan dituang pada medium BHI-A lalu diinokulasi dengan jarum ose. Setelah itu pada tiap cawan petri dibuat 5 lubang sumuran berdiameter 5 mm. dilakukan pemberian bahan uji $50\mu\text{L}$ ekstrak daun *Pluchea indica* konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%, kontrol positif (NaOCl 5,25%) dan kontrol negatif (akuades), masing-masing dilakukan triplo. Medium BHI Agar yang telah ditumbuhi *P. gingivalis* dan diberi perlakuan ekstrak daun *Pluchea indica* diinkubasi menggunakan inkubator pada suhu

37°C , dilakukan pengamatan setelah 24 jam. Selanjutnya zona hambat adanya zona hambat disekitar sumuran diukur dengan jangka sorong.

Analisis statistik

Data dianalisis dengan uji *Shapiro-wilk*. Apabila data terdistribusi normal ($p>0,05$), akan dilakukan uji ANOVA satu jalan, jika didapatkan hasil perbedaan yang bermakna ($p<0,05$) maka uji *Post Hoc* dilakukan. Uji statistik dilakukan dengan SPSS statistik untuk Macintosh versi 25.

HASIL PENELITIAN

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilaksanakan di pusat kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), ekstrak daun *Pluchea indica* terbukti mengandung flavonoid, tanin, terpenoid (Tabel 1) dan telah terkonfirmasi merupakan tanaman *Pluchea indica* dari hasil identifikasi daun dan cabang muda yang dilakukan.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak daun *Pluchea indica*

Sampel	Jenis Uji Fitokimia	Hasil Uji	Metode
Ekstrak Daun <i>Pluchea indica</i>	a. Alkaloid	-	Kualitatif
	b. Flavonoid	+	
	c. Tanin	+	
	d. Saponin	-	
	e. Terpenoid	+	

Hasil penelitian memperlihatkan terbentuknya zona hambat pada konsentrasi 100% dan 50%, sedangkan tidak ada zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 25%, 12,5% dan 6,25% (Gambar 1–2). Diameter rata-rata zona hambat di sekitar sumuran kemudian diklasifikasikan sebagai respons hambat pertumbuhan bakteri menurut Davis dan Stout (Tabel 2).

Berdasarkan hasil uji *Shapiro-wilk*, data berdistribusi normal ($p>0,05$), kemudian dilanjutkan uji ANOVA satu jalan dengan hasil terdapat perbedaan yang bermakna pada data yang diperoleh ($p<0,05$). Kemudian dilakukan uji *Post Hoc*, dengan hasil terdapat perbedaan bermakna pada konsentrasi 100% dan 50% jika dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak 25%, 12,5%, 6,25%, dan kontrol negatif. Artinya ada perbedaan yang signifikan diantara rerata diameter zona hambat pada konsentrasi 100% dan 50% bila dibandingkan dengan konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, dan kontrol negatif.

Tabel 2. Klasifikasi Davis dan Stout

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan
≥ 20 mm	Sangat Kuat
11-19 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
> 5 mm	Lemah

DISKUSI

Terbentuknya zona hambat di sekeliling sumuran memperlihatkan bahwa ekstrak daun *Pluchea indica* mempunyai efek antibakteri terhadap pertumbuhan *P.gingivalis*. Pada penelitian ini menunjukkan adanya respon hambatan pertumbuhan bakteri yang tergolong **Tabel 3.** Hasil rata-rata diameter zona hambat ekstrak daun *Pluchea indica* terhadap *Porphyromonas gingivalis*

No.	Konsentrasi Ekstrak daun <i>Pluchea indica</i>	N	Rata-rata Zona Hambat ± Standar Deviasi
1.	Akuades	3	0
2.	Ekstrak 6,25%	3	0
3.	Ekstrak 12,5%	3	0
4.	Ekstrak 25%	3	0
5.	Ekstrak 50%	3	10,216 ± 0,722
6.	Ekstrak 100%	3	13,023 ± 0,636
7.	NaOCl 5,25%	3	12,803 ± 0,553

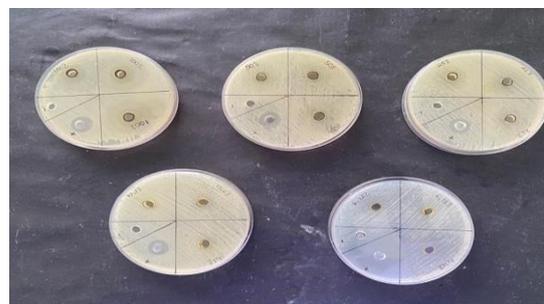
Hal ini dikarenakan ekstrak dengan konsentrasi yang lebih kecil memiliki kandungan senyawa aktif yang lebih sedikit, menyebabkan kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri akan semakin menurun.¹⁰ Daya difusi ekstrak diketahui berperan dalam menentukan hasil penelitian. Difusi dari senyawa aktif ekstrak dipengaruhi oleh kadar konsentrasi ekstrak, semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin cepat difusi senyawa aktif yang terjadi. Hal ini menyebabkan diameter zona yang terbentuk semakin besar.¹¹

Penggunaan pelarut etanol dalam proses pengestrakan karena kapabilitasnya dalam melarutkan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, alkaloid dan terpenoid.¹² Selain itu, pelarut etanol tidak bersifat toksik.¹³ Pelarut etanol 96% dipilih karena memiliki hasil rendemen ekstrak yang memperlihatkan kemampuan mengekstrak senyawa aktif yang lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi 60%, 80%, dan 70%.¹⁴

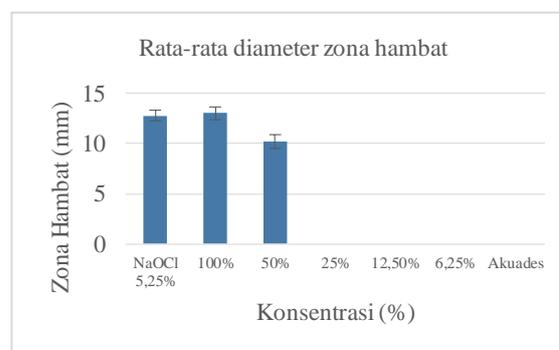
Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilaksanakan di pusat kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) memperlihatkan bahwa ekstrak daun *Pluchea indica* ini mempunyai kandungan zat aktif berupa flavonoid, tanin dan terpenoid yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Namun tidak diketahui secara pasti zat aktif mana yang paling berperan besar dalam penelitian ini.

Mekanisme daya antibakteri flavonoid yaitu dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri, menyebabkan kebocoran protein yang mengakibatkan kebocoran pada dinding sel bakteri, menghambat sintesis protein bakteri, dan mengganggu fungsi DNA sel bakteri.¹⁵ Terdapat juga

sedang pada konsentrasi 50% yaitu sebesar 10,216 ± 0,722 mm dan tergolong kuat pada konsentrasi 100% yaitu sebesar 13,023 ± 0,636 mm, sedangkan tidak ada zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 6,25%, 12,5%, dan 25% (Tabel 3).



Gambar 1. Grafik rata-rata diameter zona hambat ekstrak daun *Pluchea indica* terhadap *Porphyromonas gingivalis* yang dapat mendenaturasi protein dan menghancurkan membran sel bakteri.¹³ Mekanisme antibakteri tanin yaitu dengan menginaktivkan adhesin sel dan menginaktivkan enzim dalam sel bakteri.¹⁶ Tanin membentuk kompleks dengan prolin yang merupakan sejenis protein di dinding sel bakteri, menyebabkan kebocoran protein sehingga dinding sel rusak dan menyebabkan kematian sel bakteri.¹⁵ Terpenoid mengganggu masuknya ion-ion penting dalam sel bakteri serta dapat mengikat lemak dan karbohidrat sehingga merusak permeabilitas dinding sel bakteri menyebabkan kerusakan dan mengakibatkan kematian pada sel bakteri.¹⁷



Gambar 2. Diameter zona hambat ekstrak daun *Pluchea indica* konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%, kontrol positif (NaOCl 5,25%), kontrol negatif (akuades) terhadap *Porphyromonas gingivalis*

Pada beberapa penelitian sebelumnya, yang dilakukan oleh Pargaputri mengenai efektivitas daun *Pluchea indica* dalam menghambat *Enterococcus faecalis* dan *Fusobacterium nucleatum* menyatakan bahwa ekstrak daun *pluchea indica* konsentrasi 50% dan 100% dapat menghambat pertumbuhan *E.faecalis* sedangkan hanya konsentrasi 100% yang hanya dapat menghambat *F.Nucleatum*.⁸ Hal ini sejalan dengan penelitian ini, pada konsentrasi 50% dan 100% ekstrak daun *Pluchea indica* memiliki daya hambat terhadap *P.gingivalis*.

Sedangkan pada penelitian lainnya yang dilakukan oleh Nahak yaitu daya hambat ekstrak daun *Pluchea indica* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* memperlihatkan zona hambat pada konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.⁹

Hasil penelitian dapat dipengaruhi oleh banyaknya kandungan senyawa aktif didalam ekstrak yang berpengaruh terhadap kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Kandungan senyawa aktif dapat berbeda-beda dalam setiap penelitian. Hal tersebut dipengaruhi oleh umur daun, kondisi tanah, dan pemberian pupuk.¹⁸

Jenis bakteri juga dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri yang terjadi. *P. gingivalis* merupakan bakteri Gram negatif yang mempunyai membran ganda, dan terdapat ruang periplasma, yang tidak ditemukan pada bakteri Gram positif. Di dalam ruang periplasma terdapat enzim yang mampu merusak molekul asing yang berasal dari luar sel bakteri. Bakteri gram negatif juga memiliki lapisan hidrofilik pada membran luar yang kaya akan molekul lipopolisakarida, yang berfungsi sebagai penahan masuknya zat antimikroba.⁸

Kontrol positif NaOCl 5,25% digunakan dalam penelitian ini sebagai pembanding, selain itu pembanding lain yang digunakan sebagai kontrol negatif yaitu akuades yang diketahui tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri. Dipilihnya NaOCl 5,25% karena mempunyai daya antibakteri yang kuat dan efektif dalam membunuh bakteri dibandingkan konsentrasi lainnya dan menjadi standar baku larutan irigasi.¹⁹ Namun, NaOCl 5,25% ini lebih bersifat toksik terhadap jaringan periradikular.²⁰ Oleh karena itu, dibutuhkan alternatif yang efektif dan aman untuk NaOCl. Kontrol positif (NaOCl 5,25%) pada penelitian ini memiliki zona hambat sebesar 12,803 ± 0,553 mm. Hasil rata-rata zona hambat pada konsentrasi ekstrak 100% lebih besar dari kontrol positif serta tidak memiliki perbedaan bermakna dengan kontrol positif dalam uji *post hoc*.

KESIMPULAN

Ekstrak daun *Pluchea indica* konsentrasi 50% dan 100% dapat menghambat pertumbuhan *P. gingivalis*. Konsentrasi 100% memiliki zona hambat terbesar. Ekstrak daun *Pluchea indica* konsentrasi 100% setara dengan kontrol positif (NaOCl 5,25%) dalam menghambat *P. gingivalis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Singh H. Microbiology of endodontic infections. *J Dent Oral Health*. 2016;2(5):1-4.
- Peciulienė V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija*. 2008;10(1):4-9.
- Sedgley C. Virulence of endodontic bacterial pathogens. In: Fouad AF, editor. *Endodontic microbiology 2nd ed*. Chapel Hill: John Wiley & Sons Inc; 2017. p.158-169.
- Olsen I, Dahle G. Salient virulence factors in anaerobic bacteria, with emphasis on their importance in endodontic infections. *Endodontics*. 2004;9:15-26.
- Machado Silveira L, Silveira C, Martos J, Suita de Castro L. Evaluation of the different irrigation regimens with sodium hypochlorite and EDTA in removing the smear layer during root canal preparation. *J Microsc Ultrastruct*. 2013;1(1):51-6.
- Fatimatuz Zahra N, Rahayu F, Ningsih NS, Feny, Darsono A, Salasia SIO. Efek antikariogenik ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) sebagai penghambat pertumbuhan streptococcus mutans penyebab karies gigi. *J Sain Vet*. 2016;34(2):182-7.
- Syafira AF, Masyhudi, Yani S. Efektivitas ekstrak etanol daun beluntas *pluchea indica* less terhadap bakteri saliva secara in vitro. *Odonto Dent J*. 2019;6(2):68-75.
- Pargaputri AF, Munadzirah E, Indrawati R. Antibacterial effects of *pluchea indica* less leaf extract on *e.faecalis* and *fusobacterium nucleatum* (in vitro). *Dent J (Maj Ked Gigi)*. 2016;93(56):93-8.
- Nahak MM. Ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. *J Kesehat Gigi*. 2013;1(1):40-50.
- Mardiana RN, Handayani N. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofarmasi*. 2016;14(1):19-24.
- Putri AVAA, Hafida N, Megawati V. Pengaruh daya antibakteri ekstrak daun stevia (*Stevia rebaudiana bertonii*) pada konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40% dan 80% terhadap *Streptococcus mutans* (in vitro). *J Ilmu Kedokt Gigi*. 2017;1(1):9-14.
- Utami LA, Putri DH. The effect of ethanol solvent concentration on antimicrobial activities the extract of andalasan endophytic bacteria (*Morus macroura miq*) fermentation product. *Eksata Berk Ilm Bid MIPA*. 2020;21(1):1-6.
- Eolia C, Syahputra A. Efektivitas antibakteri ekstrak etanol daun tin (*Ficus carica* L.) terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara in vitro. *J Kedokt Gigi Univesitas Padjadjaran*. 2019;31(3):171-7.
- Luginda RA, Sari BL, Indriani L. Pengaruh variasi konsentrasi pelarut etanol terhadap kadar flavonoid total daun beluntas (*Pluchea indica* Less) dengan metode Microwave-Assisted Extraction (MAE). *J Bid Farm*. 2018;1(1):1-9
- Nahak MM, Tedjasulaksana R, Sumerti NN. Ability difference of beluntas leaf (*Pluchea indica* L) ethanol extract and avocado leaf

- (*Persea americana* Mill) ethanol extract in Inhibiting caries-causing *Streptococcus mutans* bacteria Growth. *Bali Med J.* 2017;6(3):387–90.
16. Agustin BA, Puspawaty N, Rizal Maarif R. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanolik Daun Beluntas (*Pluchaea indica* Less.) dan Meniran (*Phyllanthus niruri* L.). *J Biomedika.* 2018;12(02):80–7.
 17. Alibasyah ZM, Andayani R, Farhana A. Potensi antibakteri ekstrak jahe (*Zingiber officinale* roscoe) terhadap *Porphyromonas gingivalis*. *J Syiah Kuala Dent Soc.* 2016;1(2):147–52.
 18. Widyawati PS, Wijaya H, Hadrjosworo PS, Sajuthi D. Evaluasi aktivitas antioksidatif ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) berdasarkan perbedaan ruas daun. *J Teknol Pangan.* 2011;5(1):1–14.
 19. Marion JJC, Duque TM. Efficiency of different concentrations of sodium hypochlorite during endodontic treatment. *Dent Press Endod.* 2012;2(4):32–7.
 20. Torabinejad M. Root canal irrigants and disinfectant. *American Association of Endodontics;* 2011.