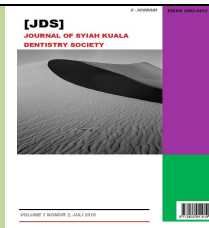




[JDS]
**JOURNAL OF SYIAH KUALA
DENTISTRY SOCIETY**

Journal Homepage : <http://jurnal.unsyiah.ac.id/JDS/>
E-ISSN : 2502-0412



AKTIVITAS ANTIBAKTERI TEPUNG CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*) TERHADAP *Enterococcus faecalis* SECARA *IN VITRO*

Ridha Andayani^{1*}, Zaki Mubarak¹, Dian Rizki Rinanda²

¹ Staf pengajar Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Syiah Kuala

² Program Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Syiah Kuala

Abstract

Enterococcus faecalis is a facultative anaerobic bacterium which can cause secondary periapical infection and is very resistant to numerous antimicrobial substances normally used during the root canal treatment. Earthworm (*Lumbricus rubellus*) possess antimicrobial peptide, known as Lumbricin-1 which is known to hinder the growth of Gram positive and Gram negative bacteria as well as fungi, but rarely caused resistance. This research was an experimental laboratory study conducted to observe the antibacterial activity of Lumbricin-1 contained in earthworm powder towards the growth of *E. faecalis in vitro*. *Enterococcus faecalis* was cultured on CHROMagar VRE media and incubated anaerobically for 24-48 hours in the temperature of 37°C. The bacterium was identified by observing the colour of the colony of the bacterium growing on the CHROMagar VRE medium and Gram staining, while antibacterial activity test was performed using disk diffusion method. Statistical analysis using one way ANOVA and Duncan test showed that there was a significant difference ($p < 0,05$) between test and control group. The result of the study showed that earthworm powder possessed strong antibacterial activity towards the growth of *Enterococcus faecalis*.

Key words: *Enterococcus faecalis*, *Lumbricus rubellus*, antimicrobial peptide, Lumbricin-1

PENDAHULUAN

Enterococcus faecalis merupakan bakteri Gram positif fakultatif anaerob dengan prevalensi resistensi antibiotik yang semakin meningkat.¹ Bakteri ini ditemukan pada 4-40% infeksi endodontik primer namun sering ditemukan dalam jumlah yang banyak pada gigi paska perawatan endodontik dengan lesi periapikal yang persisten.^{2,3} Penyebab utama kegagalan perawatan endodontik adalah kemampuan bertahan hidup dari bakteri yang ada di bagian apikal gigi. *E. faecalis* memiliki kemampuan untuk melekat di dinding saluran akar dan membentuk biofilm sehingga lebih resisten terhadap fagositosis, antibodi dan antibakteri yang diberikan. Resistensi bio-

Email address : ridha_andayani@yahoo.com

film terhadap agen antibakteri telah lama dihubungkan dengan matriks polimer ekstraseluler yang berfungsi untuk melindungi bakteri di dalam biofilm.² Selain sebagai penyebab kegagalan perawatan saluran akar, *E. faecalis* juga dikenal sebagai patogen bagi manusia dan menjadi penyebab dari 80% infeksi yang biasa disebabkan oleh *Enterococci*.⁴

Prevalensi resistensi *E. faecalis* yang semakin tinggi telah menjadi suatu permasalahan serius di bidang kedokteran, khususnya kedokteran gigi.⁴ Tingginya jumlah *E. faecalis* yang ditemukan pada saluran akar paska perawatan endodontik telah lama dikaitkan dengan kegagalan perawatan itu sendiri.³ Salah satu upaya yang kerap dilakukan untuk mengatasi masalah tersebut adalah dengan

* Corresponding author

melakukan penelitian mengenai bahan-bahan alami yang bersifat antibakteri.

Menurut Sinha *et al.*, pentingnya peran cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam kehidupan manusia telah diakui sejak dahulu kala. Pengobatan Cina sendiri telah mencatat adanya 40 kegunaan cacing tanah, salah satunya adalah sebagai antibakteri.⁵ Berbagai penelitian klinis yang telah dilakukan menyimpulkan bahwa cacing tanah memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan dalam ilmu pengobatan modern.⁵ Penelitian yang dilakukan oleh Mihara *et al.* (1992) telah menemukan bahwa cacing tanah yang berasal dari keluarga *Lumbricidae* memiliki enzim fibrinolitik yang dapat memecah fibrin dan mengaktifkan plasminogen.⁶ Liu *et al.* juga telah membuktikan bahwa cacing tanah dapat meningkatkan imunitas dan penelitian yang dilakukan oleh Cho *et al.* telah berhasil mengisolasi peptida yang bersifat antibakteri dari cacing tanah.^{7,8}

Aktivitas antibakteri cacing tanah sebagian besar disebabkan oleh adanya peptida antibakteri yang berfungsi untuk melindungi cacing tanah dari mikroorganisme patogen yang hidup di lingkungan yang sama dengannya. Peptida antibakteri merupakan substrat yang sangat penting karena antibodi yang ada pada cacing tanah tidak cukup untuk mempertahankan diri dari serangan mikroorganisme patogen.^{9,10} Lumbricin-1 merupakan peptida antibakteri yang telah berhasil diidentifikasi dari cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan bekerja dengan cara melubangi dinding sel bakteri dan dapat mengakibatkan kematian bakteri. Peptida ini terbukti mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram negatif, Gram positif dan jamur.⁷

Penelitian yang dilakukan oleh Julendra dan Sofyan (2007) telah membuktikan bahwa tepung cacing tanah (*L. rubellus*) memiliki aktivitas antibakteri yang nyata terhadap *Escherichia coli*. Penelitian tersebut menggunakan larutan tepung cacing tanah dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% dengan menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO).⁸

Penelitian yang dilakukan oleh Sandra (2012) juga membuktikan bahwa tepung cacing tanah (*L. rubellus*) dengan konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40% dan 80% dalam pelarut akuades dapat menghambat pertumbuhan *Shigelladysenteriae*. Biblio (2011) juga telah membuktikan bahwa

tepung cacing tanah (*L. rubellus*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhii*.¹¹

Berdasarkan masalah yang telah dikemukakan di atas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap *E. faecalis*. Pemilihan tepung cacing tanah dari spesies *L. rubellus* sebagai bahan alam yang akan diuji berdasarkan pada teori adanya senyawa peptida antibakteri yaitu Lumbricin-1 yang bersifat antibakteri. Senyawa ini diharapkan dapat menghambat pertumbuhan *E. faecalis* secara *in vitro*, sehingga dapat dikembangkan pada penelitian-penelitian selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Timbangan analitik, (Ohaus), Gelas ukur (Pyrex), Cawan petri (Pyrex), Tabung reaksi (Pyrex), Rak tabung, Jarum ose, Labu Erlenmeyer (Pyrex), Pipet Eppendorf, Lampu spiritus, Kaca preparat (object glass), Autoklaf (Aesculap), Sterilisator (Jouan), Inkubator (Memmert), Kaleng, Anaerogen (Oxoid), Lemari pendingin (LG), Mikroskop cahaya (Olympus), Kapas lidi steril, Kapas Kertas cakram, Vortex, Aluminium foil, Microwave, Kertas, Pinset, Jangka sorong (Caliper), Kertas label, Tissue, dan Alat tulis.

Beberapa bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Media MHA, Akuades, NaCl 0,9%, Kristal violet, Lugol, Safranin, Etanol 96%, Dimetil sulfoksida (DMSO) 100%, Asam asetat 50%, dan CHROMagar VRE (Oxoid) dengan formula¹² :

Agar	15,0 g/L
Peptones and yeast extract	20,0 g/L
Salts	5,0 g/L
Chromogenic mix	27,3 g/L

Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat yang tahan panas disterilisasi dengan cara dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas lalu dimasukkan ke dalam sterilisator pada suhu 150°C selama 2 jam. Bahan yang akan digunakan disterilisasi dengan menggunakan autoklaf selama 15-20 menit pada suhu

121°C.^{13,14}

Kultur dan Identifikasi *E. faecalis*

Kultur dan identifikasi *E. faecalis* dilakukan pada media *CHROMagarVRE*.¹² Kultur *E. faecalis* dilakukan dengan menggunakan teknik goresan (*streaking*). Goresan diambil dari biakan murni dengan jarum ose yang sebelumnya telah dipijarkan di atas lampu spiritus. Jarum ose yang telah mengandung biakan lalu digoreskan secara zig-zag di atas media *CHROMagar VRE*. Cawan petri yang telah digoreskan bakteri dimasukkan kedalam kaleng yang sebelumnya telah diisi dengan *anaerogen*, lalu diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.^{13,14} Koloni *E. faecalis* akan tampak berwarna biru toska di atas media *CHROMagar VRE*.¹²

Identifikasi *E. faecalis* selanjutnya akan dilakukan dengan pewarnaan Gram. Caranya adalah dengan membuat preparat ulas (*smear*) pada kaca obyek dengan menggunakan jarum ose, lalu kaca obyek dilewatkan di atas lampu spiritus agar pulasan bakteri terfiksasi pada permukaan kaca preparat. Setelah difiksasi panas, preparat bakteri ditetesi dengan kristal violet lalu dibiarkan selama 20 detik. Setelah 20 detik, pewarna dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Berikutnya, preparat bakteri ditetesi lugol dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan akuades. Langkah berikutnya adalah mencuci preparat bakteri dengan pemucat warna, yaitu etanol 96%, dan kaca obyek dimiringkan pada sudut 45° agar seluruh permukaan kaca obyek dialiri alkohol selama 20 detik atau sampai zat warna kristal violet tidak terlihat lagi mengalir dari kaca obyek. Setelah itu kaca obyek dicuci lagi dengan akuades dan dikeringkan. Setelah kering, preparat bakteri ditetesi safranin selama 1 menit lalu dicuci dengan akuades. Kelebihan air pada preparat diserap dengan menekankan kertas serap ke atasnya, lalu kaca obyek dibiarkan mengering dengan sendirinya. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan minyak emersi tanpa kaca tutup. *E. faecalis* merupakan bakteri Gram positif dan akan tampak berwarna ungu.^{13,14,15}

Pembuatan Larutan Tepung Cacing Tanah

Pembuatan larutan tepung cacing tanah dilakukan sesuai dengan petunjuk pelarutan peptida dengan sedikit modifikasi. Tepung cacing tanah sebanyak 300 mg, 400 mg, 500 mg

dan 600 mg dimasukkan dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 2,5 ml asam asetat 50% ditambahkan pada tiap-tiap tabung lalu dihomogenkan dengan *vortex* selama 8 menit. Berikutnya ditambahkan lagi 2,5 ml asam asetat 50% pada setiap tabung dan *divortex* lagi selama 7 menit. Supernatan pada permukaan larutan diambil sebanyak 0,1 ml dengan mikropipet dan dipindahkan ke tabung reaksi steril lainnya. Supernatan dicampurkan dengan 4,5 ml air steril dengan tujuan normalisasi asam asetat 50% hingga mencapai konsentrasi 1%.¹⁶

Sebelumnya telah dilakukan uji pendahuluan dengan menggunakan 25 mg, 50 mg, 75 mg dan 100 mg tepung cacing tanah yang dilarutkan dalam 100 ml DMSO 100% dengan cara pelarutan yang sama seperti di atas, namun pada konsentrasi ini tidak ada zona terang yang terbentuk. Uji pendahuluan berikutnya masih menggunakan pelarut DMSO 100%, namun dengan takaran tepung cacing tanah dan pelarut yang sama dengan yang digunakan pada perlakuan dengan asam asetat. Perbedaannya hanya pada jumlah air steril yang ditambahkan untuk normalisasi pelarut, yaitu sebanyak 4,9 ml.¹⁶ Pada uji pendahuluan ini juga tidak ada zona terang yang terbentuk, sehingga untuk perlakuan selanjutnya digunakan pelarut asam asetat 50%.

Pembuatan Suspensi *E. faecalis*

Pembuatan suspensi *E. faecalis* dilakukan dengan memindahkan 1-2 ose koloni *E. faecalis* dari cawan petri ke dalam tabung reaksi berisi larutan NaCl 0,9% dengan menggunakan jarum ose. Selanjutnya kekeruhan suspensi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm dan nilai absorbansi 0,08-0,1 atau setara dengan McFarland 0,5 atau $1,5 \times 10^8$ colony forming unit (CFU)/ml.^{13,15}

Uji Aktivitas Antibakteri Tepung Cacing Tanah dan Kelompok Kontrol terhadap *E. faecalis*

Suspensi bakteri yang telah diukur kekeruhannya tadi diswab dengan menggunakan kapas lidi steril secara merata pada media MHA dan didiamkan selama 5 menit. Kertas cakram berdiameter 6 mm yang telah disediakan masing-masing direndam dalam 1 ml larutan tepung cacing tanah, CHX 2%, DMSO 10% dan

asam asetat 1% selama ± 30 menit lalu diletakkan di atas media MHA dengan menggunakan pinset steril. Kertas cakram yang direndam dalam CHX 2% digunakan sebagai kontrol positif, sementara kertas cakram yang direndam dalam DMSO 10% dan asam asetat 1% digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam kaleng yang sebelumnya telah diisi dengan *anaerogen*, lalu diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, zona terang yang terbentuk akan diukur dengan menggunakan jangka sorong. Perlakuan akan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.^{8,14,15,16}

Hasil pengukuran yang didapat dinyatakan dalam satuan milimeter (mm) dan diinterpretasikan berdasarkan tabel di bawah ini:

Tabel 1. Kategori Daya Hambat Antibakteri Menurut Davis dan Stout^{17,18}

Daya Hambat Antibakteri	Kategori Daya Hambat Antibakteri
≥ 20 mm	Sangat kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah

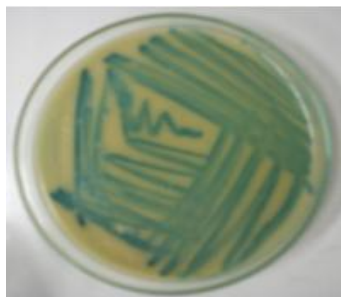
Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini akan dianalisis menggunakan *one way* ANOVA yang kemudian akan dilanjutkan dengan uji Duncan.¹⁹

HASIL PENELITIAN

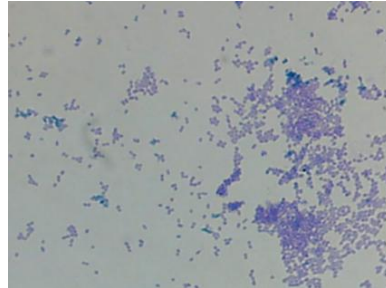
Hasil Kultur dan Identifikasi *E. faecalis*

Koloni *Enterococcus faecalis* yang tumbuh pada media *CHROMagar VRE* tampak berwarna hijau kebiruan, halus dan licin setelah diinkubasi secara anaerob selama 24 jam pada suhu 37°C (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil Kultur *E. faecalis*. Koloni bakteri berwarna hijau kebiruan.

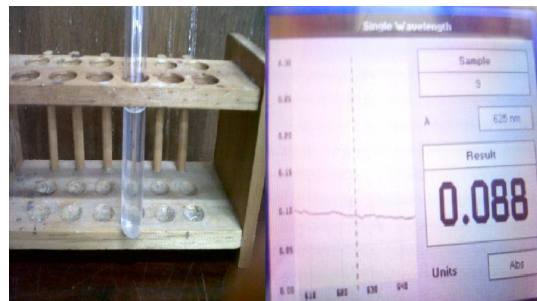
Hasil pewarnaan Gram *E. faecalis* menunjukkan koloni yang berwarna ungu, sehingga dapat disimpulkan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri Gram positif. Secara morfologis, bakteri tampak berbentuk kokus dan membentuk rantai pendek (Gambar 2)



Gambar 2. Hasil Pewarnaan Gram *E. faecalis*. Koloni tampak berwarna ungu, kokus, dan membentuk rantai pendek.

Hasil Suspensi *E. faecalis*

Koloni *E. faecalis* dimasukkan ke dalam tabung berisi NaCl 0,9% yang kemudian dihitung kekeruhannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm dan nilai absorbansi 0,08-0,1 yang nilainya setara dengan larutan *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Pada Gambar 3. menunjukkan nilai absorbansi 0,088 sehingga dapat disimpulkan kekeruhan *E. faecalis* sudah setara dengan larutan *Mc Farland* 0,5.

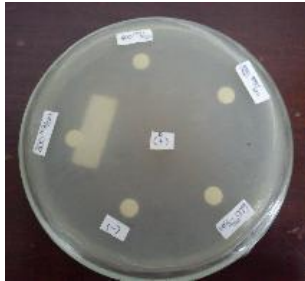


Gambar 3. Hasil Suspensi *E. faecalis*. Nilai absorbansi menunjukkan 0,088.

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap *E. faecalis*

Hasil uji aktivitas antibakteri larutan

tepung cacing tanah pada seluruh konsentrasi yaitu konsentrasi 25%, 50%, 75% dan 100% dengan pelarut DMSO 100% tidak menunjukkan adanya pembentukan zona terang di sekitar 500mg/5ml dan 600mg/5ml dengan pelarut yang sama. DMSO 10% yang digunakan sebagai kontrol negatif juga tidak menunjukkan adanya pembentukan zona terang (Gambar 4).

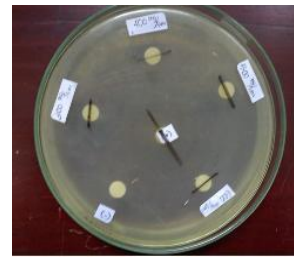


Gambar 4. Hasil Uji Larutan Tepung Cacing Tanah terhadap *E. faecalis*. Tepung cacing tanah yang dilarutkan dengan DMSO 100% tidak menunjukkan adanya zona terang pada seluruh konsentrasi larutan.

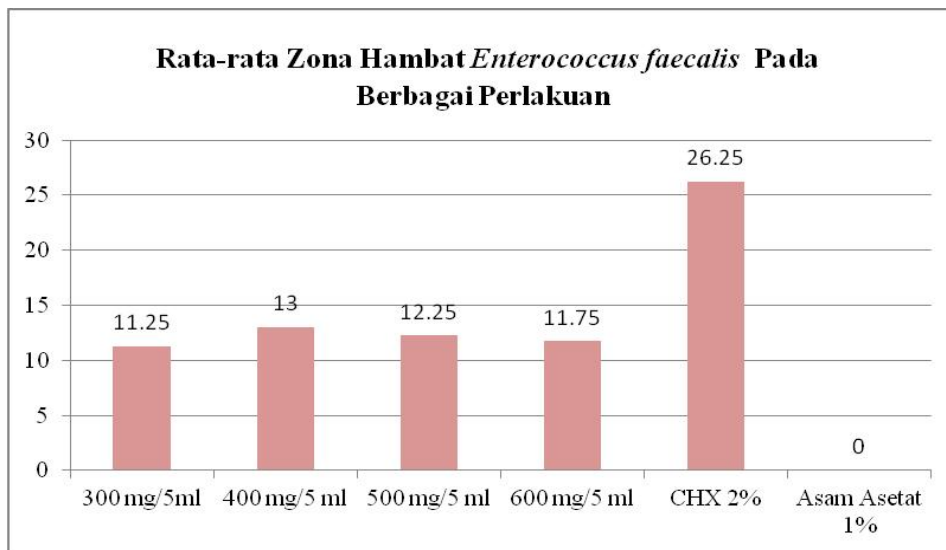
Hasil uji aktivitas antibakteri larutan tepung cacing tanah menunjukkan adanya pembentukan zona terang pada konsentrasi 300mg/5ml, 400mg/5ml, 500mg/5ml dan 600mg/5ml dengan pelarut asam asetat

kertas cakram, begitu juga dengan hasil uji larutan tepung cacing tanah dengan konsentrasi 300mg/5ml, 400mg/5ml

(CH₃COOH) 50%, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5. Zona terang juga tampak di sekitar kertas cakram yang mengandung CHX 2%, sedangkan kertas cakram yang mengandung asam asetat 1% yang digunakan sebagai kontrol negatif tidak menunjukkan adanya zona terang (Gambar 5). Hasil uji aktivitas antibakteri larutan tepung cacing tanah terhadap *E. faecalis* dapat dilihat pada tabel 1., sementara hasil rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 5. Hasil Uji Larutan Tepung Cacing Tanah terhadap *E. faecalis* Tepung cacing tanah yang dilarutkan dengan asam asetat 50% menunjukkan adanya zona terang pada seluruh konsentrasi larutan



Gambar 6. Diagram Batang Zona Hambat Berbagai Konsentrasi Larutan Tepung Cacing Tanah dengan Pelarut Asam Asetat 50% dan Kelompok Kontrol terhadap *Enterococcus faecalis*.

Data pada Gambar 6. menunjukkan rata-rata diameter zona terang terbesar terdapat pada konsentrasi 400mg/5ml yaitu 13 mm, dan rata-rata diameter zona terang terkecil pada konsentrasi 300mg/5ml yaitu 11,25 mm, sedangkan pada kontrol negatif (asam asetat 1%) tidak terbentuk zona hambat. Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), hasil uji normalitas menunjukkan sebaran data pada keseluruhan konsentrasi larutan tepung cacing tanah normal. Selain itu pada hasil uji homogenitas diperoleh nilai Sig. 0,077 yang berarti nilai $p > 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data tersebut homogen.

Hasil uji *one way ANOVA* menunjukkan bahwa nilai F_{hitung} sebesar 172,655 lebih besar daripada nilai F_{tabel} yang bernilai 3,06 sehingga dapat disimpulkan bahwa

hipotesis diterima. Dengan kata lain tepung cacing tanah memiliki aktivitas antibakteri yang nyata terhadap *E. faecalis*. Hasil uji Duncan penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa semua konsentrasi uji menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kontrol negatif (yang ditunjukkan dengan *superscript* yang berbeda). Hal ini menunjukkan bahwa kontrol negatif mampu menekan heterogenitas galat dan terlihat jelas bahwa larutan tepung cacing tanah dalam berbagai konsentrasi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. faecalis*. Larutan tepung cacing tanah konsentrasi 300mg/5ml, 400mg/5ml, 500mg/5ml dan 600mg/5ml menunjukkan aktivitas antibakteri yang sama. Aktivitas antibakteri yang paling kuat ditunjukkan oleh kontrol positif, yaitu CHX 2%.

Tabel 2. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Tepung Cacing Tanah terhadap *E. faecalis* dengan Uji Duncan pada Taraf Kritis 5%.

	Perlakuan	$X \pm SD$
P0	(Asam asetat 0,1%)	0,00 ^a \pm 0,00
P1	(Larutan tepung cacing tanah konsentrasi 300mg/5ml)	11,25 ^b \pm 1,26
P2	(Larutan tepung cacing tanah konsentrasi 400mg/5ml)	13,00 ^b \pm 0,82
P3	(Larutan tepung cacing tanah konsentrasi 500mg/5ml)	12,25 ^b \pm 0,96
P4	(Larutan tepung cacing tanah konsentrasi 600mg/5ml)	11,75 ^b \pm 0,50
P5	(CHX 2%)	26,25 ^c \pm 2,50

Keterangan: *Superscript* huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bakteri *Enterococcus faecalis* sebagai bakteri yang diuji. Penanaman dan identifikasi awal *E. faecalis* pada penelitian ini dilakukan pada media *CHROMagar VRE* yang merupakan media selektif untuk strain *Enterococcus* yang resisten terhadap vankomisin. Koloni *E. faecalis* yang tumbuh pada media *CHROMagar* tampak berwarna hijau kebiruan. Hal ini disebabkan oleh reaksi antara enzim spesifik yang dimiliki *E. faecalis* dengan komponen kromogenik yang terkandung dalam media *CHROMagar VRE*.²⁰

Langkah identifikasi selanjutnya adalah melalui pewarnaan Gram. Bakteri yang diberikan pewarnaan Gram pada penelitian ini tampak

berwarna ungu dan berbentuk kokus. Hal ini sesuai dengan deskripsi morfologis *E. faecalis* yang merupakan bakteri berbentuk kokus, baik tunggal atau membentuk rantai pendek serta merupakan bakteri Gram positif, sehingga tampak berwarna ungu di bawah mikroskop cahaya.^{2,3,4}

Warna ungu pada *E. faecalis* didapat dari ikatan antara kristal violet dan iodium yang digunakan saat pewarnaan Gram. Bakteri Gram positif seperti *E. faecalis* memiliki struktur dinding sel yang terdiri dari 90% peptidoglikan, sementara bakteri Gram positif hanya memiliki 5-10% peptidoglikan pada dinding selnya. Dinding sel yang lebih tebal pada bakteri Gram positif akan menyusut saat

diberi alkohol karena terjadinya dehidrasi, menyebabkan pori-pori dinding sel menutup sehingga mencegah larutnya ikatan kristal violet dan iodium. Bakteri Gram negatif mempunyai kandungan lipid yang lebih tinggi pada dinding selnya dan lipid pada umumnya larut dalam alkohol. Larutnya lipid oleh alkohol diduga memperbesar pori-pori dinding sel dan menyebabkan proses pemucatan pada bakteri Gram negatif berlangsung lebih cepat.^{13,14}

Pengujian aktivitas antibakteri pada awalnya akan dilakukan pada media CHROMagar VRE, namun karena persediaan CHROMagar VRE yang ada sangat terbatas, maka pengujian akhirnya dilakukan pada media MHA. Sementara konsentrasi larutan tepung cacing tanah yang akan diuji awalnya ditentukan sebesar 25%, 50%, 75% dan 100% dalam pelarut DMSO 100%, namun konsentrasi ini terlalu kecil bila dibandingkan dengan konsentrasi minimal yang dianjurkan, yaitu 5-10mg/ml, sehingga pada konsentrasi ini tidak ada zona hambat yang terbentuk.²¹

Perlakuan berikutnya menggunakan 300 mg, 400 mg, 500 mg dan 600 mg tepung cacing tanah yang masing-masing dilarutkan dalam 5 ml DMSO, namun pada perlakuan ini juga tidak ada zona hambat yang terbentuk. Zona hambat baru terbentuk saat sebanyak 300 mg, 400 mg, 500 mg dan 600 mg tepung cacing tanah dilarutkan dengan asam asetat 50%.¹⁶

Pemilihan DMSO sebagai pelarut didasarkan pada kemampuan DMSO untuk melarutkan berbagai senyawa, khususnya peptida.²² DMSO memiliki kemampuan untuk menembus membran sel, namun pada penggunaan DMSO sebagai pelarut, konsentrasi akhir DMSO tidak boleh melebihi 10% karena dapat menyebabkan pecahnya membran sel. Konsentrasi akhir DMSO sebanyak 10% didapatkan dengan menambahkan air steril setelah tepung cacing tanah larut dalam DMSO.^{23,24,25}

Hasil uji aktivitas antibakteri yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa zona hambat tidak terbentuk pada larutan tepung cacing tanah yang dilarutkan dengan DMSO. Hal ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Julendra dan Sofyan pada tahun 2007, dimana terbentuk zona hambat pada larutan tepung cacing tanah dengan konsentrasi terhadap bakteri *Escherichia coli*.⁸ Perbedaan

hasil ini kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan terhadap bakteri yang diujikan. Selain itu, *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif, sehingga struktur dinding selnya berbeda dengan *E. faecalis*.²⁶

Zona hambat yang tidak terbentuk pada larutan tepung cacing tanah yang dilarutkan dengan DMSO terjadi karena peptida target, yaitu Lumbricin-1 yang terkandung dalam tepung cacing tanah tidak dapat larut dalam DMSO. Hal ini terjadi karena komposisi dari Lumbricin-1 yang memiliki asam amino metionin sistein dan triptofan dalam strukturnya (Gambar 6.1.). Penggunaan DMSO pada peptida yang mengandung metionin, sistein dan triptofan akan menyebabkan pembentukan ikatan sulfoksida atau disulfid yang menyebabkan Lumbricin-1 menjadi tidak aktif.²¹

```

1  GG CAC GAG CTA TCT CTC TGC ATC ACT CTC CCT TTC CCC TCT CTC 47
48 TCT CTC ATT ATC TTG CTG TCT CTC TGT CTG ACT ATC ATG TCT CTC TGT 95
1  Met Ser Leu Cys 4
96 ATC TCT GAC TAT CTC TAT CTG ACT CTG ACT TTC TCA AAG TAC GAA CGC 143
5 Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Leu Thr Phe Ser Lys Tyr Glu Arg 20
21 Gln Lys Asp Lys Arg Pro Tyr Ser Glu Arg Lys Asn Gln Tyr Thr Gly 36
144 CAG AAG GAC AAG AGG CCA TAC TCG GAA CGC AAG AAC CAA TAC ACG GGT 191
21 Gln Lys Asp Lys Arg Pro Tyr Ser Glu Arg Lys Asn Gln Tyr Thr Gly 36
192 CCG CAG TTC CTC TAT CCT CCG GAG CGC ATC CCA CCG CAG AAG GTC ATC 239
37 Pro Gln Phe Leu Tyr Phe Pro Glu Arg Ile Pro Pro Gln Lys Val Ile 52
240 AAA TGG AAC GAG GAG GGT CTT CCC ATC TAC GAA ATC CCC GGC GAA GGA 287
93 Lys Trp Asn Glu Gly Leu Pro Ile Tyr Glu Ile Pro Gly Gly Gly 48
288 GGT CAC GCA GAA CCA GCT GCC TAG GTT AGA TTT CAG CTG AAC CGA 335
69 Gly His Ala Gly Pro Ala Ala Ala ** 77
336 TTG CCA ACC GGA GAG GAA GAG AGT TGA TTT CGA TAG AGC GTG TGG ACA 383
384 GAA CTA TCA GCG TTC TTT TTA CCA TCG TCG CTA TAA GTC TAT CAC TCT 431
432 TAG AGG ATC AAG TAG ATT GCG TAG ACC TAG TTA ACT AAA CCT AAA TCA 479
480 ATT GTT GTC TTG GTT TTA AAT GAG TGG AGA GGA AAA TTA AAC AAA TTA 527
528 CAA CCC CTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A 555
    
```

Gambar 7. Struktur Asam Amino Lumbricin-1.

Kelarutan peptida sangat bergantung pada faktor karakteristik pelarut dan zat terlarut merupakan faktor penting yang harus diperhatikan. Lumbricin-1 adalah peptida yang bermuatan +1 yang dibentuk dari 10 asam amino bermuatan positif dan 9 asam amino yang bermuatan negatif.⁷ Peptida yang memiliki muatan +1 atau lebih hanya akan larut dalam larutan yang bersifat asam. Oleh sebab itu pada penelitian digunakan pelarut yang bersifat asam, yaitu asam asetat.²¹

Hidrofobisitas Lumbricin-1 menentukan aktivitas antibakteri yang dimilikinya, karena hidrofobisitasnya akan berhubungan secara langsung dengan cara pelarutannya. Lumbricin-1 merupakan peptida yang 22% molekulnya bersifat hidrofobik.⁷ Peptida yang hidrofobisitasnya <25% biasanya akan larut dalam air.²¹ Penelitian yang dilakukan oleh Ekasari dkk. (2012) mengenai daya antibakteri

tepung cacing tanah terhadap *Vibrio harveyi* menggunakan air sebagai pelarut, namun penelitian ini tidak menemukan adanya zona hambat yang terbentuk.²⁷ Hal ini dapat disebabkan oleh muatan positif yang dimiliki Lumbricin-1, sehingga asam asetat 50% tetap merupakan pilihan yang lebih baik dibandingkan dengan air. Selain itu, agar peptida yang ada larut dengan sempurna, untuk cara pelarutannya digunakan metode *drop wise*, dimana pelarut yang berupa asam asetat ditambahkan ke tepung cacing tanah secara bertahap, dan masing-masing tahap diikuti dengan pelarutan menggunakan *vortex*.²¹ Selanjutnya air steril ditambahkan ke dalam larutan hingga konsentrasi asam asetat mencapai 1%. Pengenceran ini dilakukan karena asam asetat konsentrasi 1% merupakan konsentrasi normalisasi dimana tidak lagi ditemukan efek lisis terhadap sel.²⁵

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa tepung cacing tanah pada konsentrasi 300mg/5ml, 400mg/5ml, 500mg/5ml dan 600mg/5ml dalam pelarut asam asetat 50% dapat menghambat pertumbuhan *E. faecalis*. Berdasarkan klasifikasi Davis dan Stout, diameter zona hambat yang terbentuk dari larutan tepung cacing tanah konsentrasi 300mg/5ml, 400 mg/5ml, 500mg/5ml dan 600mg/5ml dengan pelarut asam asetat 50% termasuk dalam kategori kuat dengan rata-rata diameter zona hambat 11,25 mm, 13 mm, 12,25 mm dan 11,75 mm. Kemampuan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam menghambat pertumbuhan *E. faecalis* menunjukkan bahwa cacing tanah *L. rubellus* mengandung Lumbricin-1 yang bersifat antibakteri.^{7,8} Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa konsentrasi larutan tepung cacing tanah yang tinggi tidak selalu menghasilkan diameter zona hambat yang besar pula. Pada konsentrasi 300mg/5ml tepung cacing tanah yang digunakan lebih sedikit dibandingkan yang lain, begitu juga peptida yang terlarut sehingga aktivitas antibakterinya lebih sedikit dibandingkan yang lain. Aktivitas antibakteri meningkat pada konsentrasi 400mg/5ml, namun kembali menurun pada konsentrasi 500mg/5ml dan 600mg/5ml. Penurunan aktivitas ini disebabkan oleh kadar tepung cacing tanah yang terlalu tinggi dibandingkan dengan pelarutnya, sehingga larutan menjadi jenuh dan sulit untuk larut.⁸

Aktivitas peptida antibakteri sangat

bergantung pada kemampuannya untuk memasuki membran sel. Peptida antibakteri dan membran sel bakteri harus memiliki interaksi elektrostatis yang hanya akan terjadi bila ada perbedaan muatan antara keduanya.^{10,28,29,30} Dinding sel bakteri Gram positif seperti *E. faecalis* mengandung 90% peptidoglikan serta lapisan tipis asam teikoat dan asam teikuronat yang bermuatan negatif, sedangkan peptida antibakteri, khususnya Lumbricin-1 memiliki muatan positif.^{7,10,26} Perbedaan muatan ini akan menyebabkan peptida tertarik ke sel hingga akhirnya memasuki membran sel bakteri.^{7,10,28,29}

Penelitian sebelumnya menyimpulkan bahwa peptida antibakteri dapat membunuh mikroorganisme dengan membuat lubang-lubang kecil, meningkatkan permeabilitas dan merusak membran sel. Setelah berhasil memasuki sel, peptida antibakteri akan mengikatkan dirinya pada DNA sel dan menghambat sintesis makromolekul dan DNA sel sehingga menyebabkan kematian sel.^{7,30}

Karakteristik lainnya yang dimiliki oleh Lumbricin-1 adalah kandungan asam amino prolinnya yang sangat tinggi, dimana dari 62 asam amino yang dimiliki oleh Lumbricin-1, 15% diantaranya merupakan prolin, seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 7.⁷ Prolin memiliki kemampuan untuk mengubah bentuk rantai peptida dan menutupi bagian yang dikenali sebagai antigen oleh sel bakteri. Saat memasuki membran sel, peptida akan dikenali sebagai bagian dari sel bakteri, bukan suatu benda asing sehingga peptida antibakteri tidak akan diserang oleh sel. Mekanisme ini dapat mencegah aktivitas membranolitik sel bakteri sampai peptida antibakteri dapat menentukan target dan menyerang sel dengan leluasa. Hal inilah yang menyebabkan Lumbricin-1 dapat menyerang berbagai sel bakteri tanpa menyebabkan toksisitas sel pejamu.^{7,28}

Sampai saat ini telah banyak ditemukan peptida antibakteri dari berbagai sumber yang kaya akan prolin, seperti apidaecin, drosocin, metchnikowin, bactenecin dan PR-39. Semua peptida antibakteri ini bermuatan positif dan memiliki kandungan prolin yang tinggi, namun memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda. Apidaecin, bactenecin dan PR-39 hanya memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif. Drosocin memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan

Gram negatif, namun tidak aktif terhadap jamur. Metchnikowin aktif terhadap bakteri Gram positif dan jamur, namun tidak aktif terhadap bakteri Gram negatif. Lumbricin-1 diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif, Gram negatif dan jamur. Hal ini menunjukkan bahwa Lumbricin-1 memiliki mekanisme yang berbeda dengan peptida antibakteri kaya-prolin yang lain, namun sayangnya sampai saat ini mekanisme kerja Lumbricin-1 dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur belum diketahui dengan pasti.^{7,28}

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dapat menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Hal ini disebabkan karena tepung cacing tanah mengandung peptida Lumbricin-1 yang bersifat antibakteri.
2. Larutan tepung cacing tanah dengan konsentrasi 300 mg dalam 5 ml asam asetat 1% menghasilkan rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis* sebesar 11,25 mm yang termasuk kategori kuat, sementara larutan tepung cacing tanah dengan konsentrasi 400 mg, 500 mg dan 600 mg masing-masing dalam 5 ml asam asetat menghasilkan rata-rata diameter zona hambat sebesar 13 mm, 12,25 mm dan 11,75 mm yang juga termasuk ke dalam kategori kuat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the national healthcare safety network at the Centers for Diseases Control and Prevention. *CDC* 2008; 29: 996-1010.
2. Matthew S, Boopathy T. *Enterococcus faecalis*: an endodontic challenge. *KSR* 2011; 33-7.
3. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson T J, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: Its role in root

canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32: 93-8.

4. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*: the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. *Endodontic Topics* 2003; 6: 135-59.
5. Sinha RK, Chauhan K, Valani D, Chandran V, Soni BK, Patel V. Earthworms: Charles Darwin’s ‘unheralded soldiers of mankind’: protective & productive for man & environment. *JEP* 2010; 1: 251-60.
6. Trisina J, Sunardi F, Suhartono MT dan Tjandrawinata RR. DLBS1033, a protein extract from *Lumbricus rubellus*, possesses antithrombotic and thrombolytic activities. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 20: 1-7.
7. Cho JH, Park CB, Yoon YG, Kim SC. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1408: 67-76.
8. Julendra H, Sofyan A. Uji *in vitro* penghambatan aktivitas *Escherichia coli* dengan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*). *Media Peternakan* 2007; 30: 41-7.
9. Karaca, A. *Soil Biology: biology of earthworms*. Berlin: Springer, 2011. p. 1.
10. Tasiemski A. Antimicrobial peptides in annelids. *ISJ* 2008; 5: 75-82.
11. Sandra M. Uji efektivitas tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Pembangunan Nasional “Veteran”, 2012. p. 6-7.
12. Anonymous. *CHROMagar VRE*. Access on: http://chromagar.com/fichiers/1259769034I_FU_CHROMagar_VRE.pdf, Oktober 2012.
13. Brown AE. *Benson’s Microbiological Applications: laboratory manual ingeneral microbiology*. 9thed. New York: McGraw-Hill, 2005. p. 73, 96. Hadioetomo RS. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: teknik dan prosedurdasar laboratorium*. Jakarta: Gramedia, 1985. hal. 32.
14. Hadioetomo RS. *Mikrobiologi Dasar*

- dalam *Praktek: teknik dan prosedurdasar laboratorium*. Jakarta: Gramedia, 1985. hal. 32.
15. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. *Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology*. 2nded. Geneva: WorldHealth Organization, 2003. p. 84, 86-9.
 16. Rinanda T, Hidayaturrahmi, Juwita. Karakterisasi SDS-Page lumbricin-1 serta uji aktivitas antibakteri tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa* resisten ciprofloxacin dan meropenem. Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala, 2012. hal. 25. Laporan Hasil Penelitian Dosen Muda.
 17. Marsa, RD. Efek antibakteri ekstrak lerak dalam pelarut etanol terhadap *Enterococcus faecalis* (penelitian *in vitro*). Medan: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatera Utara, 2010. hal. 19. Skripsi
 18. Dharmawati IG. Efek ekstrak mengkudu dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* penyebab dental plak secara *in vitro*. Program Studi Ilmu Kedokteran Biomedik Universitas Udayana, 2011. hal. 4. Tesis.
 19. Dahlan, MS. *Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan*. ed.4. Jakarta: Salemba Medika; 2009. hal. 83-95.
 20. Merlino J, Siarakas S, Robertson GJ, Funnell GR, Gottlieb T, Bradbury R. Evaluation of CHROMagar orientation for differentiation and presumptive identification gram-negative bacilli and *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 1788-93.
 21. ProImmune. *Peptide solubility*. Access on: <http://www.thinkpeptides.com/peptidesolubility.html>, Desember 2012.
 22. Anonymous. *Dimethyl sulfoxide (DMSO): a dipolar, aprotic reaction solvent*. Los Angeles: Gaylord Chemical Company, L.L.C., 2007. p. 1-3.
 23. Anonymous. *DMSO concentration in cellular assays*. Access on: <http://www.researchgate.net>, Desember 2012.
 24. Anonymous. *Research protocol*. Access on: <http://www.protocol-online.org>, Desember 2012.
 25. AnaSpec Inc. *Peptide Solubility Guidelines*. Fremont: EGT Group, 2008. p. 1-2.
 26. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Brock Biology of Microorganism*. 10th ed. Illinois: Southern Illinois University, 2003. p. 110.
 27. Ekasari, Tjahjaningsih W, Cahyoko Y. Daya antibakteri tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* secara *in vitro*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 2012; 4: 1-6.
 28. Yeaman MR, Yount NY. Mechanism of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 27-55.
 29. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002; 415: 389-95.
 30. Park CB, Kim HS, Kim HC. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 1: 253-25