

## KONSENTRASI HAMBAT DAN BUNUH MINIMUM EKSTRAK DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) Terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* SECARA IN VITRO

Afrina<sup>\*</sup>, Santi Chismirina<sup>\*</sup>, Risa Yulanda Magistra<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Syiah Kuala

<sup>\*\*</sup> Program Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Syiah Kuala

### ABSTRAK

Periodontitis agresif merupakan kelainan jaringan yang progresif pada orang dewasa muda sehat yang didominasi oleh bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Perawatan periodontitis agresif dengan penggunaan antibiotik berkepanjangan dapat menyebabkan bakteri *A. actinomycetemcomitans* menjadi resisten, oleh sebab itu alternatif perawatan dapat dilakukan dengan pemberian tanaman yang mengandung antibakteri, salah satunya daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan obat tradisional yang sering digunakan untuk berbagai macam penyakit dan diketahui memiliki kandungan aktif yang bersifat antibakteri. Zat aktif yang terkandung tersebut alkaloid, polifenol, saponin, flavonoid, kuinon dan steroid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans* secara *in vitro*. Penelitian eksperimental laboratoris ini menggunakan sampel *A. actinomycetemcomitans* isolat klinis yang telah diidentifikasi sebelumnya dan daun jeruk nipis yang diekstraksi menggunakan metode maserasi. Ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diuji efek antibakterinya terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans* dengan metode *Standard Plate Count* (SPC). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan koloni pada konsentrasi 0,25% berjumlah  $386 \times 10^3$  CFU/ml dan paling sedikit ditemukan pada konsentrasi 20% berjumlah  $1,5 \times 10^3$  CFU/ml. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditemukan pada konsentrasi 0,25% dan tidak ditemukan adanya Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

**Kata kunci:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, antibakteri, periodontitis, daun jeruk nipis

### ABSTRACT

Aggressive periodontitis is a progressive tissue abnormalities in healthy young which is dominated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Long term antibiotic use can cause bacteria *A. actinomycetemcomitans* to become resistant, therefore, alternative treatments can be done by giving the plants that contain antibacterial, for example like lime (*Citrus aurantifolia*) leaves. Lime (*Citrus aurantifolia*) leaves is a traditional medicine that is often used for a variety of illnesses and its chemical compounds have known for their antibacterial activity. The chemical compound of lime (*Citrus aurantifolia*) leaves are alkaloids, saponin, polyphenols, flavonoids kuinon, and steroid. The purpose of this study was to known antibacterial effect of lime leaves againts *in vitro* growth of *A. actinomycetemcomitans*. Lime (*Citrus aurantifolia*) leaves that used maseration method for extraction as the sample. Lime (*Citrus aurantifolia*) leaves extract was determined their antibacterial activity using *Standard Plate Count Method*. The results of this study showed that the colony growth at concentrations of 0,25% amounting to  $386 \times 10^3$  CFU/ml and the least was found in concentrations of 20% which is amounting to  $1,5 \times 10^3$  CFU/ml. Based on this study could be concluded that the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was found at concentrations of 0,25 % and Minimum Bactericidal Consentration (MBC) was not found.

**Key words:** *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, antibacterial, periodontitis, lime leaves

## PENDAHULUAN

Penyakit periodontal merupakan penyakit infeksi kronis yang paling umum terjadi pada manusia.<sup>1</sup> Angka kejadian periodontitis bervariasi pada berbagai negara di dunia. Prevalensi di Amerika tahun 2009–2010 menunjukkan total periodontitis pada usia 30 tahun ke atas sebesar 47,2% (mewakili sekitar 64,7 juta orang dewasa berusia 30 tahun ke atas).<sup>2</sup> Menurut hasil survei kesehatan gigi dan mulut tahun 2009, di Indonesia penyakit periodontal terjadi pada 459 orang diantara 1000 penduduk.<sup>3</sup> Salah satu bentuk penyakit periodontal adalah periodontitis agresif.<sup>4</sup> Periodontitis agresif merupakan penyakit inflamasi pada jaringan pendukung gigi yang perkembangan penyakitnya cepat, ditandai dengan hilangnya perlekatan jaringan ikat dan kerusakan tulang alveolar secara cepat pada lebih dari satu gigi permanen.<sup>5,6</sup> *A. actinomycetemcomitans* merupakan bakteri patogen yang dominan pada penderita periodontitis agresif.<sup>5</sup>

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) adalah bakteri Gram-negatif berbentuk kokobasil dengan ukuran 0,4–0,5 µm x 1,0–1,5 µm, non-motile dan bersifat anaerob fakultatif.<sup>7</sup> *A. actinomycetemcomitans* memiliki beberapa faktor virulensi seperti Leukotoksin, Cytolethal Distending Toxin (CDT), Chemotactic Inhibitor Factor, Lipopolisakarida dan Kolagenase yang berperan pada dalam merusak jaringan dan resorpsi tulang pada periodontitis agresif.<sup>8</sup>

Perawatan periodontitis agresif berupa *scaling* dan *root planning*, pemberian antibiotik dan tindakan pembedahan.<sup>9</sup> Antibiotik yang digunakan untuk perawatan periodontitis agresif ini adalah tertrasiklin, metronidazole dan amoksisilin.<sup>10</sup> Penggunaan antibiotik yang berulang-ulang dan tidak tepat adalah penyebab utama peningkatan jumlah bakteri yang resisten terhadap obat. Oleh sebab itu alternatif yang dapat dilakukan adalah memanfaatkan tanaman yang mengandung antibakteri sebagai pengganti obat.<sup>11</sup> Salah satu dari tanaman tersebut adalah Daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

Tumbuhan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dikenal sebagai salah satu jenis tanaman yang digunakan sebagai bumbu masakan maupun obat-obatan, contohnya dalam mengatasi masalah disentri, sembelit, jerawat, pusing, batuk, bau badan, menambah

nafsu makan, mencegah rambut rontok, ketombe, flu, demam, kegemukan, amandel, dan peradangan hidung, bronkitis, asma dan herpes.<sup>12-14</sup> Pada daun jeruk nipis terdapat kandungan bioaktif seperti alkaloid, polifenol, saponin, tanin, flavonoid dan triterpenoid yang berfungsi sebagai antibakteri.<sup>12,13</sup>

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Reddy dkk (2012) menyatakan bahwa ekstrak daun jeruk nipis pada konsentrasi 20% efektif sebagai antimikroba dalam membunuh bakteri Gram-negatif, diantaranya *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* dan juga dapat membunuh bakteri Gram-positif, yaitu *Bacillus cereus*, *Enterobacter faecalis*, dan *Staphylococcus aureus*. Sedangkan daya hambat minimum pada bakteri rata-rata adalah 0,25%.<sup>12</sup> Penelitian daya hambat minyak atsiri pada daun jeruk nipis juga telah dilakukan oleh Pertiwi (2013) dimana terdapat aktivitas hambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, pada konsentrasi 20%, 40%, dan 80% (cit. Razak, 2009).<sup>14</sup>

Berdasarkan uraian di atas maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans* secara in vitro.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan desain *post-test only control grup*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Keguruan dan Ilmu Pengetahuan (FKIP) Universitas Syiah Kuala (Unsyiah) untuk proses ekstraksi dan uji fitokimia daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) Universitas Syiah Kuala Banda Aceh untuk pengujian hasil ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap *A. actinomycetemcomitans*.

Sampel pada penelitian ini adalah daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang berasal dari daerah Perkebunan Sekolah Pertanian Menengah Atas (SPMA) Seulawah Aceh Besar dan sampel *A. actinomycetemcomitans* diambil dari isolat klinis penderita periodontitis agresif yang telah diidentifikasi sebelumnya di Laboratorium Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) Universitas Gadjah Mada (UGM).

Semua alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu. Kemudian dilakukan pembuatan ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Sebanyak 1 kg daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) berwarna hijau tua, segar dan permukaannya mengkilat dicuci, dikeringkan dan dihaluskan hingga menjadi serbuk. Selanjutnya proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, serbuk daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) direndam dengan pelarut etanol 96%, kemudian dilakukan penyaringan sampai didapat filtrate dan ampas. Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak pekat dan tidak mengandung etanol.<sup>15</sup> Dilakukan uji fitokimia ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) untuk mengetahui adanya kandungan alkaloid, polifenol, saponin, tanin, flavonoid dan triterpenoid.<sup>16-19</sup> Ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diencerkan dengan aquadest sampai diperoleh konsentrasi 0,25%, 0,5%, 1%, 5%, 10% dan 20%. Akuades tanpa dicampur ekstrak daun jeruk nipis digunakan sebagai kontrol negatif dan *ciprofloxacin* 10 µg digunakan sebagai kontrol positif.

Bakteri *A. Actinomycetemcomitans* dikultur di media AaGM agar dengan suasana anaerob kemudian diinkubasi di dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C.<sup>15</sup> Setelah koloni bakteri tumbuh, dilakukan uji konfirmasi dengan pewarnaan Gram.<sup>20</sup> Bakteri yang telah tumbuh di media AaGM diambil kemudian dimasukkan kedalam NaCl 0,9% 5 ml, dihomogenkan dan disetarakan kekeruhannya dengan larutan Mc Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml).<sup>21</sup> Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat (*serial dilution*). Setelah itu, diambil sebanyak 0,1 ml dari semua tabung diteteskan ke media MHA dengan metode *spread plate* dengan menggunakan batang L, dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C pada suasana anaerob. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dengan melakukan penghitungan koloni *A. actinomycetemcomitans* menggunakan *colony counter* dengan syarat jumlah koloni yang tumbuh pada media adalah 30–300 CFU/ml.<sup>22</sup>

Penentuan KHM dan KBM diawali dengan menyiapkan 8 tabung reaksi. Tabung 1 diisi dengan 1 ml *ciprofloxacin* 10 µg/ml (kontrol positif), tabung 2 diisi 1 ml akuades

steril (kontrol negatif), selanjutnya tabung 3 diisi ekstrak daun jeruk nipis konsentrasi 0,25%, tabung 4 diisi ekstrak daun jeruk nipis konsentrasi 0,5%, tabung 5 diisi ekstrak daun jeruk nipis konsentrasi 1%, tabung 6 diisi ekstrak daun jeruk nipis konsentrasi 5%, tabung 7 diisi ekstrak daun jeruk nipis konsentrasi 10% dan tabung 8 diisi ekstrak daun jeruk nipis konsentrasi 20%. Masing-masing tabung tersebut diisi sebanyak 1 ml ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Kemudian semua tabung diisi 1 ml *Trypticase Soy Broth* (TSB), dan 0,1 ml suspensi *A. actinomycetemcomitans* dimasukkan ke dalam masing-masing tabung lalu dihomogenkan.

Selanjutnya diambil 0,1 ml suspensi dari masing-masing tabung, dikultur di media MHA dengan metode sebar (*spread plate*) dibuat dalam suasana anaerob dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah koloni tumbuh, dilakukan penghitungan koloni dan penentuan KHM dan KBM. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah cawan petri yang memiliki jumlah koloni bakteri yang lebih sedikit dibandingkan cawan petri kelompok kontrol negatif. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah cawan petri yang tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri.<sup>21</sup>

Analisis data hasil penelitian dilakukan dengan metode *one way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh atau tidak pada tiap kategori perlakuan. Jika terdapat pengaruh maka dilanjutkan dengan uji lanjut *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna.



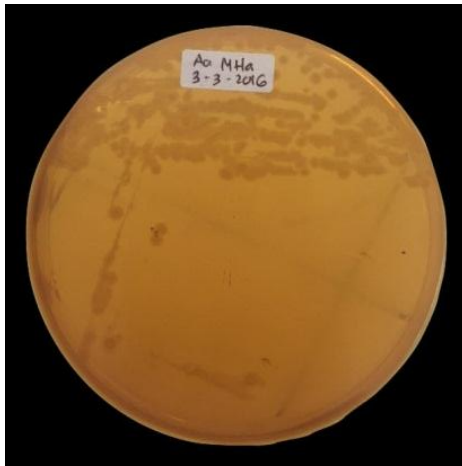
Gambar 1. Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

## HASIL PENELITIAN

Daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) ditimbang sebanyak 1 kg yang diekstrak dengan metode maserasi menggunakan 2 liter pelarut etanol 96% selama 3 hari, didapatkan ekstrak kental sebanyak 10 mg seperti yang terlihat pada Gambar 1 di atas.

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mengandung alkaloid, saponin, polifenol, flavonoid, kuinon, dan steroid (Tabel 1).

Hasil kultur koloni *A. actinomycetemcomitans* yang dilakukan pada media AaGM agar kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dalam suasana anaerob, menunjukkan morfologi koloni berbentuk bulat cembung, permukaan kasar, dan berwarna krem, seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Kultur Koloni *A. actinomycetemcomitans* pada Media AaGM Agar

Hasil pewarnaan Gram dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x100, terlihat morfologi *A. actinomycetemcomitans* berbentuk kokobasilus dengan warna merah muda seperti Gambar 3. Hal ini membuktikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri Gram-negatif.



Gambar 3. Hasil Pewarnaan Gram *A. Actinomycetemcomitans*

Pada penelitian ini pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans* dilakukan sebanyak 2 kali pengulangan. Jumlah rata-rata koloni *A. actinomycetemcomitans* setelah dilakukan pengujian menunjukkan pertumbuhan koloni yang paling banyak pada akuades ( $469,5 \times 10^3$  CFU/ml) dan paling sedikit adalah pada *Ciprofloxacin* ( $0,5 \times 10^3$  CFU/ml). Jumlah rata-rata koloni bakteri juga terlihat menurun pada setiap kenaikan konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Uji statistik yang digunakan pada penelitian ini adalah *One Way ANOVA* yang memiliki syarat lebih dari dua kelompok, distribusi dan homogenitas varian data sama. Penelitian ini memiliki 8 kelompok yang terdiri dari 6 kelompok perlakuan (0,25%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%) dan 2 kelompok kontrol (*ciprofloxacin*) sebagai kontrol positif dan (akuades) sebagai kontrol negatif. Hasil uji normalitas menunjukkan distribusi dan homogenitas varian data penelitian adalah normal dengan nilai  $p > 0,05$ . Hasil uji ANOVA menunjukkan nilai  $p < 0,05$ , membuktikan

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

| No | Uji          | Perubahan Reaksi                    | Hasil |
|----|--------------|-------------------------------------|-------|
| 1. | Alkaloid     | Terjadi perubahan warna             | +     |
| 2. | Saponin      | Terbentuk gelembung                 | +     |
| 3. | Tanin        | Tidak terbentuk larutan putih keruh | -     |
| 4. | Polifenol    | Larutan hijau kehitaman             | +     |
| 5. | Flavonoid    | Larutan coklat                      | +     |
| 6. | Kuinon       | Larutan putih                       | +     |
| 7. | Steroid      | Larutan biru hijau                  | +     |
| 8. | Triterpenoid | Larutan biru hijau                  | -     |

Tabel 2. Jumlah Rata-Rata Koloni *A. actinomycetemcomitans* Setelah Diuji dengan Ekstrak Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

| Konsentrasi Bahan Uji  | Jumlah Koloni <i>A. actinomycetemcomitans</i><br>Setelah Diuji dengan Ekstrak Daun Jeruk<br>Nipis (Per Pengulangan ) |                       | Rata-Rata Jumlah<br>Koloni (CFU/ml) |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
|                        | 1                                                                                                                    | 2                     |                                     |
| 0,25%                  | 390 x 10 <sup>3</sup>                                                                                                | 382 x 10 <sup>3</sup> | 386 x 10 <sup>3</sup>               |
| 0,5%                   | 93 x 10 <sup>3</sup>                                                                                                 | 80 x 10 <sup>3</sup>  | 86,5 x 10 <sup>3</sup>              |
| 1%                     | 17 x 10 <sup>3</sup>                                                                                                 | 21 x 10 <sup>3</sup>  | 19 x 10 <sup>3</sup>                |
| 5%                     | 11 x 10 <sup>3</sup>                                                                                                 | 9 x 10 <sup>3</sup>   | 10 x 10 <sup>3</sup>                |
| 10%                    | 3 x 10 <sup>3</sup>                                                                                                  | 5 x 10 <sup>3</sup>   | 4 x 10 <sup>3</sup>                 |
| 20%                    | 1 x 10 <sup>3</sup>                                                                                                  | 2 x 10 <sup>3</sup>   | 1,5 x 10 <sup>3</sup>               |
| Akuades                | 475 x 10 <sup>3</sup>                                                                                                | 464 x 10 <sup>3</sup> | 469,5 x 10 <sup>3</sup>             |
| Ciprofloxacin 10 µg/ml | 0 x 10 <sup>3</sup>                                                                                                  | 1 x 10 <sup>3</sup>   | 0,5 x 10 <sup>3</sup>               |

Tabel 3. Uji Least Significant Difference (LSD)

| Kelompok Perlakuan | P1     | P2     | P3     | P4     | P5     | P6     | Akuades | Cipro  |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| P1                 | -      | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000*  | 0,000* |
| P2                 | 0,000* | -      | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000*  | 0,000* |
| P3                 | 0,000* | 0,000* | -      | 0,102  | 0,015* | 0,007* | 0,000*  | 0,005* |
| P4                 | 0,000* | 0,000* | 0,102  | -      | 0,253  | 0,119  | 0,000*  | 0,087  |
| P5                 | 0,000* | 0,000* | 0,015* | 0,253  | -      | 0,622  | 0,000*  | 0,493  |
| P6                 | 0,000* | 0,000* | 0,007* | 0,119  | 0,622* | -      | 0,000*  | 0,843  |
| Akuades            | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | -       | 0,000* |
| Cipro              | 0,000* | 0,000* | 0,005* | 0,087  | 0,493  | 0,843  | 0,000*  | -      |

\*= p<0,05; terdapat perbedaan bermakna

terdapatnya pengaruh dari kelompok uji terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans*. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans* ditunjukkan pada konsentrasi 0,25%, dan tidak ditemukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada penelitian ini. Hasil uji lanjut *Least Significant Difference* (LSD) 0,25%, 0,5%, 1%, 5%, 10% dan 20% dengan kontrol negatif menunjukkan nilai p<0,05, sehingga dapat disimpulkan adanya perbedaan yang bermakna dari konsentrasi ekstrak tersebut dengan kontrol negatif (akuades). Hasil uji lanjut LSD dapat dilihat pada Tabel 3.

## PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan teknik maserasi untuk proses ekstraksi komponen zat aktif. Metode ini dipilih karena relatif sederhana dan mudah, dan tidak memerlukan proses pemanasan yang dapat merusak komponen aktif dari simplisia.<sup>23,24</sup> Proses maserasi dilakukan menggunakan pelarut etanol. Pelarut etanol digunakan karena

memiliki kemampuan untuk melarutkan bahan aktif yang bersifat polar, semi polar, ataupun nonpolar. Selain itu, pelarut etanol diketahui tidak bersifat toksik. Berbagai peneliti menyebutkan kelebihan pelarut etanol untuk mengekstraksi senyawa aktif tumbuhan, baik yang bersifat antioksidan maupun yang bersifat sebagai antibakteri.<sup>23,25</sup>

Setelah proses maserasi, dilakukan uji fitokimia untuk membuktikan bahwa pada ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terkandung alkaloid, polifenol, saponin, tanin, flavonoid dan triterpenoid yang berfungsi sebagai antibakteri. Dari hasil uji fitokimia ini juga ditemui adanya kuinon dan steroid, hal ini diduga karena kuinon termasuk golongan fenol dan steroid termasuk golongan saponin. Sehingga tidak disebutkan secara terpisah.<sup>26</sup> Namun dari hasil uji fitokimia pada penelitian ini tidak ditemukan adanya kandungan tanin dan triterpenoid, hal ini disebabkan karena bahan uji yaitu daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya. Komposisi senyawa yang terkandung dalam tanaman dipengaruhi oleh berbagai faktor.

Baik faktor internal maupun eksternal. Faktor internal seperti adanya pengaruh pada varietas/gen dan yang termasuk faktor eksternal yaitu, adanya pengaruh cahaya matahari, curah hujan, struktur tanah, maupun iklim di daerah tersebut sehingga terdapat perbedaan terhadap kandungan daun jeruk nipis.

Pada penelitian ini morfologi koloni *A. actinomycetemcomitans* terlihat berbentuk bulat cembung, permukaan kasar, dan berwarna krem. Media selektif yang digunakan pada penelitian ini adalah *A. actinomycetemcomitans* Growth Medium (AaGM) agar. Media AaGM mengandung *yeast extract* yang dapat meningkatkan pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans*. *Yeast extract* digunakan untuk enumerasi mikroorganisme dalam air bersih yang menyediakan sumber nitrogen, asam amino, vitamin, dan karbon yang diperlukan untuk pertumbuhan organisme.<sup>6,27</sup> Hal ini didukung dengan penelitian Reddy dkk (2012) yang menyatakan bahwa pada media selektif, *A. actinomycetemcomitans* diisolasi dari rongga mulut membentuk koloni sirkuler dengan diameter 1–2 mm, memiliki peninggian yang cembung, tepi yang irreguler, translusen, serta struktur internal berbentuk seperti bintang.<sup>27,28</sup>

Hasil pewarnaan Gram-negatif yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bentuk koloni bakteri kokobasilus dan berwarna merah muda sehingga dapat disimpulkan *A. actinomycetemcomitans* merupakan bakteri Gram-negatif yang berbentuk kokobasilus. Bakteri Gram-negatif memiliki kandungan lipid yang lebih banyak pada dinding selnya, sementara bakteri Gram-positif memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan yang lebih tebal. Akibat perbedaan tersebut, bakteri yang ditetesi kristal violet dan iodine memiliki ketahanan yang berbeda. Bakteri Gram-positif cenderung dapat mempertahankan kompleks kristal violet dan iodine setelah ditetesi etanol 96%, akibat kandungan peptidoglikan yang lebih tebal pada dinding selnya.<sup>26</sup>

Kompleks kristal violet dan iodine juga dapat meningkatkan aktivitas pengikatan suatu zat warna oleh bakteri, sehingga pada saat ditetesi dengan safranin, bakteri Gram-positif tetap memperlihatkan tampilan berwarna ungu. Bakteri Gram-negatif tidak dapat mempertahankan kompleks tersebut karena

dinding selnya mengandung lipid yang lebih banyak. Senyawa lipid akan larut setelah ditetesi etanol, sehingga dapat menyebabkan permukaan dinding sel bakteri akan membentuk pori. Terbentuknya pori tersebut mengakibatkan tidak dapat ditahannya kompleks kristal violet dari permukaan dinding sel bakteri setelah ditetesi etanol, sehingga bakteri Gram-negatif dapat menyerap warna safranin, dan tampilan koloni bakteri Gram-negatif akan terlihat berwarna merah muda.<sup>29,30</sup> Hasil uji aktivitas antibakteri daun jeruk nipis terhadap *A. actinomycetemcomitans* menunjukkan bahwa ekstrak daun jeruk nipis tersebut secara signifikan mampu menghambat pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans*. Kemampuan tersebut terjadi karena di dalam daun jeruk nipis terkandung zat-zat antibakteri seperti alkaloid, tanin, polifenol, saponin, flavonoid dan triterpenoid. Replikasi DNA dari *A. actinomycetemcomitans* dihambat oleh alkaloid dan tanin yang terdapat pada daun jeruk nipis. Selain itu, rusaknya permeabilitas dinding sel *A. actinomycetemcomitans* disebabkan oleh flavonoid dan terganggunya stabilitas serta proses pembentukan membran dan dinding sel *A. actinomycetemcomitans* dibantu oleh saponin dan triterpenoid sehingga dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans*. Sedangkan *A. actinomycetemcomitans* dapat mengalami kematian sel saat fungsi fisiologis bakteri terganggu oleh polifenol.<sup>31,32</sup>

Pada penelitian ini pemilihan konsentrasi berdasarkan penelitian Reddy (2012). Hasil uji aktivitas antibakteri daun jeruk nipis menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans*. Secara statistik, pertumbuhan koloni pada konsentrasi 0,25% terdapat perbedaan bermakna dengan kontrol negatif (akuades). Ini menjelaskan bahwa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terdapat pada konsentrasi 0,25%. Hal ini disebabkan jumlah rata-rata koloni yang tumbuh pada konsentrasi 0,25% lebih sedikit dibandingkan dengan akuades. Perbedaan jumlah koloni yang bermakna antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol negatif (akuades) terlihat pada semua konsentrasi yaitu 0,25%, 0,5%, 1%, 5%, 10% dan 20%, sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum pada penelitian ini tidak dapat diamati. Hal ini diduga karena konsentrasi yang digunakan hanya sampai pada konsentrasi 20%. Penelitian ini didukung

oleh penelitian Reddy (2012) dengan menggunakan konsentrasi ekstrak daun jeruk nipis 0,25%, 0,5%, 1%, 5%, 10% dan 20% pada bakteri *Bacillus cereus*, *Enterobacter faecalis*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian tersebut menunjukkan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) rata-rata pada bakteri adalah 0,25%, sedangkan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) pada 20% efektif sebagai antimikroba dalam membunuh bakteri.<sup>12</sup>

Berbeda dengan penelitian Reddy (2012), pada penelitian ini KBM tidak ditemukan disebabkan bakteri masih mampu bertahan pada konsentrasi 20% dengan rata-rata jumlah koloni  $1,5 \times 10^3$  CFU/ml, begitu juga pada *Ciprofloxacin*, bakteri masih mampu bertahan dengan rata-rata koloni  $0,5 \times 10^3$  CFU/ml. Ini disebabkan oleh bakteri Gram-negatif, selnya dikelilingi oleh membran tambahan (*outer membrane*), sehingga permukaan bakteri menjadi hidrofilik. Hal ini dapat berfungsi sebagai *permeability barrier* untuk agen eksternal lainnya. Efek ini juga dapat disebabkan oleh adanya molekul lipopolisakarida (LPS) pada *outer membrane* tersebut, sehingga bakteri Gram-negatif akan resisten terhadap antibiotik yang bersifat hidrofobik. Selain itu, juga disebabkan karena adanya *Outer Membrane Vesicle* (OMV) yang terdapat pada bakteri *A. actinomycetemcomitans* memperlihatkan kemampuan untuk membawa berbagai protein, termasuk CDT kedalam sel *host*. *Cytolethal Distension Toxin* (CDT) yang dihubungkan dengan OMV juga terlihat pada isolat *A. actinomycetemcomitans* serotip b dan c. Peneliti lainnya juga menyebutkan OMV tidak hanya berperan dalam mengeluarkan CDT, namun juga faktor virulensi lain dari bakteri.<sup>29</sup> Pola resistensi bakteri Gram-negatif juga diketahui dapat terjadi akibat penutupan celah/pori (*loss of porion*) pada dinding sel bakteri, sehingga menurunkan jumlah agen antimikroba yang melintasi membran sel. Bakteri Gram-negatif juga memperlihatkan peningkatan aktivitas pompa keluar (*efflux pumps*), sehingga agen antimikroba tidak dapat berinteraksi dengan tempat target.<sup>33</sup>

Kemampuan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. actinomycetemcomitans* tidak terlepas dari senyawa aktif yang bersifat

antibakteri yang terdapat pada daun jeruk nipis. Alkaloid dikaitkan dengan kemampuannya dalam menghambat replikasi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) dengan cara dengan menghambat aktivasi enzim yang berperan pada proses pengarahuan nukleotida pada pita DNA. Adanya gangguan replikasi DNA juga dapat menyebabkan gangguan pembelahan sel.<sup>34</sup> Polifenol mempunyai aktivitas denaturasi protein dengan cara berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga struktur protein sel bakteri menjadi rusak. Hal tersebut akan mengganggu fungsi fisiologis bakteri yang lambat laun akan menyebabkan kematian sel bakteri, sedangkan saponin adalah substansi bersabun yang memiliki efek pembersihan.<sup>34</sup> Flavonoid mempunyai mekanisme membentuk kompleks dengan protein ekstraselular dan dinding sel bakteri, menyebabkan berhentinya aktivitas metabolisme bakteri, dan kematian sel.<sup>35</sup> Steroid mempunyai kemampuan berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat impermeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun, morfologi membran sel berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel rapuh dan lisis. Kuinon mempunyai kemampuan sebagai antibiotik dan penghilang rasa sakit serta merangsang pertumbuhan sel baru pada kulit.<sup>35</sup>

## KESIMPULAN

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans* adalah pada konsentrasi 0,25%, sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) tidak dapat ditentukan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Kler S, Malik R. An update on the virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* – a systematic review. *STM Journals* 2010; **1(1)**:1-10.
2. Eke P, Dye B, Wei L. Prevalence of periodontitis in adult in the United State: 2009-2010. *J Dent Res* 2012; **91(10)**: 914-920.
3. Wahyukundari M. Perbedaan kadar matrix metalloproteinase-8 setelah scalling dan pemberian tetrasiklin pada penderita periodontitis kronis. *JURN PDGI* 2009; **58(1)**: 1-6.

4. Roshna T, Nandakumar K. Generalized aggressive periodontitis and its treatment options: case reports and review of the literature. *Case Report in Medicine* 2011; **2012**:1-17.
5. Novak KF, Novak MJ. Aggressive Periodontitis. In: *Carranza's clinical periodontology* (Newman MG, Takei HH, Klickkevoid PR, Carranza FA, eds). 11<sup>th</sup> ed. Missouri: Saunders Elsevier. 2012: 169-171.
6. Noack B, Hoffman T. Aggressive Periodontitis. *Clinical and Research Reports* 2004; **1(4)**: 335-344.
7. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A\* periodontopathogen. *Periodontology* 2010; **54**:78-105.
8. Kler S, Malik R. An update on the virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* – a systematic review. *STM Journals* 2010; **1(1)**:1-10.
9. Mi Hwa Jung, Jin Woo Park, Jo Young, Jae Mok Lee. Clinical case report on treatment of generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Implant Sci* 2010; **40**:249-253
10. Ardila CM, Lopez MA, Guzman IC. High resistance against clindamycin, metronidazole, and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; **1(15)**:947-951.
11. Anonymous. *Use antibiotics rationally*. WHO. 2011.
12. Reddy L, Jalli D, Jose B, Gopu S. Evaluation of antibacterial & antioxidant activities of the leaf essential oil & leaf extracts of *Citrus aurantifolia*. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research* 2012; **2(2)**:346-354.
13. Khan PR, Gali PR, Pathan P. *In vitro* antimicrobial activity of *Citrus aurantifolia* and its phytochemical screening. *Life Sciences Feed* 2012; **1(2)**: 13-16.
14. Razak A, Djamal A, Revilla G. Uji daya hambat air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* s.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus Aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas* 2013; **2(1)**:5-8.
15. Ar Rasyid KH. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) terhadap pertumbuhan *A. actinomycetemcomitans* sebagai agen penyebab periodontitis agresif. Banda Aceh: Universitas Syiah Kuala. *Skripsi* 2012: 21.
16. Rija'I H, Syafnir L, Uji aktifitas antioksidan ekstrak bertingkat daun sirih hitam (*Piper acre blume*) dengan radikal bebas dpgh (1,1-difenil-2-pikril hidrazil). *Prosiding Penelitian SPeSIA* 2015; 58-64.
17. Putra A, Bogoriani W. Ekstraksi zat warna alam dari bonggol tanaman pisang (*musa paradiasciaca*) dengan metode maserasi, refluks, dan sokletasi. *JURNAL KIMIA* 2014; **8(1)**:113-119.
18. Dent M, Uzelac VD, Penic M, Brncic M. The effect of extraction solvent, temperature, and time on the composition and mass fraction of polyphenol in dalmation wild sage (*Salvia officinalis* L.) extract. *Biotechnol* 2013; **51(1)**:84-91
19. Rakesh DD, Longo G, Khanuja SPS, Handa SS. Ekstraksi Technologies for medicinal and Aromatic Plants. *International Centre For Science And High Technology Trieste* 2008; 22-23.
20. Miranti M, Prasetyorini. Perbandingan aktivitas antibakteri ekstrak etanol 30% dan 96% kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap bakteri *staphylococcus aureus*. *Ekologia* 2013; **13(1)**: 9-18.
21. Tsuzukibashi O, Takada K, Saito M, Kimura C, Yoshikawa T, Makimura M, Hirasawa M. A novel selective medium for isolation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res* 2008; **43**:544–548.
22. European Committee For Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAT). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical microbiology and infection* 2000; **6(9)**: 1-8.
23. Dent M, Uzelac VD, Penic M, Brncic M. The effect of extraction solvent, temperature, and time on the composition and mass fraction of polyphenol in dalmation wild sage (*Salvia officinalis* L.) extract. *Biotechnol* 2013; **51(1)**:84-91.
24. Rakesh DD, Longo G, Khanuja SPS, Handa SS. Ekstraksi Technologies for medicinal and Aromatic Plants.

- International Centre For Science And High Technology Trieste* 2008: 22-23
25. Pasaribu F, Sitorus P, Bahri S. Uji Ekstrak Etanol Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L*) terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology* 2012; **1(1)**:1.
  26. Paul G Engelkirk, Janet Duben-Engelkirk. *Laboratory diagnosis of infectious disease*. Baltimore: LWW. 2008: 126-132.
  27. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A\* periodontopathogen. *Periodontology* 2010; **54**:78-105.
  28. Mythireyi D, Krishnababa MG. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, an aggressive oral bacteria – a review. *International Journal of Health Sciences and Research* 2012; **2**:105-117.
  29. Robert W. Bauman. *Microbiology with disease by taxonomy*. 3<sup>rd</sup> ed. San Francisco: Pearson. 2011: 97-105.
  30. Isdaryanti, Abdullah A, Nawir NHA. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Lignoselulosa Asal Rumen Sapi. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Hasanuddin.
  31. Zahro L, Agustini R. Uji efektivitas antibakteri ekstrak kasar saponin jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *UNESA Jurnal of Chemistry* 2013; **2(3)**:120-122.
  32. Liantari D, Effect of wuluh starfruit leaf extract for *Streptococcus mutans* growth. *J Majority* 2014; **3(7)**:27-33.
  33. Bockstael K, Aerschot AV. Antimicrobial resistance in bacteria. *Review Article* 2006; 1-16.
  34. Winarsih S, Andini KR, Primivanny K. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus Amaryllifolius Roxb.*) Terhadap *Streptococcus mutans* Strain 2302-UNR Secara *In Vitro*. Universitas Brawijaya. 2011: 1-7.
  35. Siregar AF, Sabdono A, Pringgenies D. Potensi antibakteri ekstrak rumput laut terhadap bakteri penyakit kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Research* 2012; **1(2)**:152-160.