

Research Report

Konsentrasi Efektif Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum* Wight) terhadap Hambatan Biofilm *Enterococcus faecalis*

(Effective Concentration of Bay Leaf Extract (*Syzygium polyanthum* Wight) to Inhibit *Enterococcus faecalis* Biofilm)

Shufiyah Nurul Aini¹, Ruslan Effendy², Ira Widjiastuti²

¹Mahasiswa Program Sarjana Kedokteran Gigi

²Staff Departemen Konservasi

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga
Surabaya-Indonesia

ABSTRACT

Background. *Enterococcus faecalis* is the most dominant microorganisms found in endodontic secondary infection with prevalence ranging between 24% - 77%. Defense mechanism of *Enterococcus faecalis* bacteria is forming biofilm. A study showed that bacteria in mature biofilms can 10-1000 times more resistant to antimicrobials than bacteria in a planktonic form. One of natural substances that can be used as antibiofilm to irrigation root canals is extract of fresh bay leaf (*Syzygium polyanthum* Wight). Chemical components in bay leaves include flavonoids, tannins, and essential oils, which have antibacterial capability and damage the membrane biofilm. **Purpose.** To determine the effective concentration of fresh bay leaf extract (*Syzygium polyanthum* Wight) that can inhibit biofilm *Enterococcus faecalis*. **Method.** This research is in-vitro laboratory experimental with post test only control group design using microtiter plate assay. Samples using *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 cultured in TSB (Trypticase Soy Broth) + glucose. Bay leaf extract (*Syzygium polyanthum* Wight) concentration in this study was 13%, 12.25%, 11.50%, 10.75%, 10%, 9.25%, 8.50%, 7.75%, 7%, and 6.25%. **Results.** At the 13% concentration of *Syzygium polyanthum* Wight, showed 100% inhibition of biofilm, means that the 13% concentration of bay leaf extract (*Syzygium polyanthum* Wight) can totally inhibit biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. **Conclusion.** The effective concentration of bay leaf extract (*Syzygium polyanthum* Wight) which can inhibit *Enterococcus faecalis* biofilm is 13%.

Keywords: *Syzygium polyanthum* Wight extract, biofilm, *Enterococcus faecalis*, effective concentration.

Korespondensi (correspondence): Shufiyah Nurul Aini, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: shufiyahnuraini@gmail.com

PENDAHULUAN

Mikroorganisme di dalam saluran akar diduga merupakan penyebab utama kegagalan perawatan saluran akar. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri yang ditemukan paling dominan menyebabkan infeksi sekunder endodontik dengan prevalensi berkisar antara 24%-77%.^{1,2} *Enterococcus faecalis* sulit dieleminasi dari saluran akar dikarenakan memiliki kemampuan untuk menembus tubulus dentin, tahan terhadap pH yang tinggi, memiliki faktor virulensi, serta dapat membentuk biofilm.³

Biofilm merupakan suatu populasi mikroorganisme yang melekat pada

permukaan biotik atau abiotik, dan terbungkus dalam Ekstraseluler Polimer Matriks (EPM) yang terdiri dari protein, polisakarida, dan asam nukleat. Pembentukan biofilm dengan cara adsorpsi molekul anorganik dan organik kemudian akan melekat dan membentuk kolonisasi dalam saluran akar, selanjutnya menjadi biofilm.⁴ Biofilm sangat sulit untuk dieliminasi dan merupakan sumber dari banyak infeksi kronis. Menurut *National Institutes of Health*, biofilm berperan lebih dari 80% pada infeksi dalam tubuh.⁵ Biofilm dapat meningkatkan toleransi bakteri terhadap antimikroba, meningkatkan virulensi bakteri, dan memiliki mekanisme pertahanan *host*

terhadap faktor lingkungan, seperti pH dan oksigen.⁶ Sebuah penelitian menunjukkan bahwa bakteri dalam biofilm yang matang bisa menjadi 10-1000 kali lebih resisten terhadap antimikroba daripada bakteri dalam bentuk planktonik.⁵

Perawatan saluran akar merupakan pilihan perawatan untuk penyakit pulpa pada saluran akar. Tujuan dari perawatan saluran akar adalah menghilangkan bakteri patogen dan produk metabolismenya dari sistem saluran akar, menghilangkan jaringan nekrotik, serta membantu proses penyembuhan periapikal. Eliminasi mikroorganisme dari akar yang terinfeksi menjadi fokus utama dalam perawatan saluran akar karena keberadaan bakteri memegang peranan penting dalam patogenesis pulpa dan periradikular serta keberhasilan dari perawatan saluran akar.^{7,8}

Perawatan saluran akar memiliki 3 prinsip dasar yaitu preparasi biomekanik, sterilisasi, serta obturasi. Selama proses preparasi biomekanik, dilakukan irigasi saluran akar yang bertujuan untuk mengeliminasi bakteri pada saluran akar, pelarut debris, pelubrikan sistem kanal sehingga preparasi saluran akar lebih mudah, dan sebagai pelarut sisa jaringan organik.⁹ Setiap bahan irigasi memiliki sifat yang berbeda-beda. Bahan irigasi yang ideal mempunyai sifat antimikroba, mampu melarutkan jaringan organik, memiliki toksisitas rendah, dan menginduksi reaksi yang menguntungkan pada jaringan periapikal.¹⁰

Bahan irigasi saluran akar konvensional yang digunakan saat ini masih memiliki berbagai kelemahan, sehingga diperlukan bahan alami yang dapat dikembangkan sebagai bahan alternatif irigasi saluran akar yang memiliki toksisitas lebih rendah, lebih biokompatibel, harga murah, dan mudah didapat. Salah satu bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan irigasi saluran akar adalah ekstrak daun salam segar (*Syzygium polyanthum* Wight).

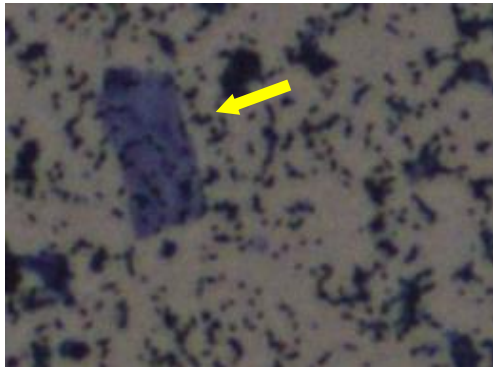
Daun salam (*Syzygium polyanthum* Wight) merupakan tanaman asli Asia Tenggara yang banyak ditemukan di Burma, Malaysia, dan Indonesia yang biasanya digunakan sebagai penyedap aroma masakan.¹¹ Daun salam telah dikenal memiliki khasiat yang besar untuk mengobati berbagai penyakit seperti hipertensi, diabetes, asam urat, diare, dan maag.¹² Selain itu daun salam juga dapat

digunakan sebagai terapi *Recurrent Aphthous Stomatitis* (RAS).¹³ Komponen kimia dalam daun salam antara lain flavonoid, tanin, minyak atsiri, saponin, alkaloida, dan polifenol. Kandungan flavonoid, tanin, dan minyak atsiri memiliki aktivitas antibakteri, sedangkan kandungan saponin memiliki daya pembersih terhadap lapisan *smear layer* dinding saluran akar. Aktivitas antibakteri flavonoid, tanin, dan minyak atsiri yaitu dengan cara mengkoagulasikan protein yang akhirnya dapat mengganggu permeabilitas membran sel dan menyebabkan inaktivasi fungsi materi genetik bakteri.¹¹ Beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ekstrak daun salam terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*.¹³⁻¹⁵ Pada penelitian Rahayu (2014) menunjukkan ekstrak daun salam memiliki kemampuan bakteriosidal terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*, tetapi sampai saat ini belum didapatkan penelitian mengenai antibiofilm ekstrak daun salam terhadap biofilm *Enterococcus faecalis*.¹⁶ Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai konsentrasi efektif ekstrak daun salam yang dapat menghambat biofilm *Enterococcus faecalis*.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental labolatoris *in-vitro* dengan rancangan penelitian *post test only control group design* yang menggunakan sampel biofilm *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* Wight) diperoleh dari Balai Penelitian dan Konsultasi Industri, Surabaya yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi.

Uji biofilm menggunakan metode *Microtitter Plate Assay*. Sesuai dengan protokol suspensi bakteri uji awal dibuat sesuai standarisasi *Mc Farland* pada media TSB (*Trypticase Soy Broth*). Suspensi bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 yang ada dikultur ke dalam *microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37° C sampai biofilm matang pada hari kelima. Dilakukan pengecatan menggunakan *Simple Staining/ Crystal Violet*.



Gambar 1 Biofilm *Enterococcus faecalis* yang tumbuh setelah inkubasi hari ke-5 yang diamati dengan mikroskop *inverted*

Setelah terbentuk biofilm, pada masing-masing sumuran ditambahkan 0,1 ml bahan uji. Diinkubasi kembali selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan pencucian *microplate* dengan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* sebanyak 3 kali untuk menghilangkan bakteri planktonik dan dikeringkan. Dilakukan pewarnaan dengan larutan *crystal violet* 0,1% sebanyak 0,2 ml dan diinkubasi dalam temperatur ruangan selama 15 menit. Cairan sisa pewarnaan dicuci dengan *aquadest* beberapa kali sampai tidak ada warna pada air bilasan, kemudian dikeringkan dan ditambahkan pelarut warna DMSO 100% sebanyak 0,1 ml. Pembacaan dengan *microplate reader* dengan panjang gelombang 570 nm.

HASIL

Tabel 1 Hasil rerata nilai OD biofilm *Enterococcus faecalis* pada masing-masing kelompok konsentrasi ekstrak daun salam

Kelompok Konsentrasi	N	\bar{x}	SD
13%	8	0	0,000001
12,25%	8	0,288	0,053237
11,50%	8	0,330	0,043736
10,75%	8	0,339	0,064409
10%	8	0,334	0,055618
9,25%	8	0,354	0,073708
8,50%	8	0,361	0,119224
7,75%	8	0,376	0,096959
7%	8	0,384	0,040359
6,25%	8	0,404	0,104222
Kontrol	8	1,084	0,104137

Keterangan : N = Jumlah sampel
 \bar{x} = rerata
 SD = Standar Deviasi

Berdasarkan hasil pembacaan nilai OD (*Optical Density*) dimana melihat kekeruhan biofilm menggunakan *ELISA reader*, didapatkan kesepuluh konsentrasi menunjukkan nilai OD yang lebih rendah dari nilai OD kelompok kontrol (+), yang berarti ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) memiliki kemampuan menghambat biofilm, Kemudian konsentrasi efektif ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) terhadap hambatan biofilm *Enterococcus faecalis* ditentukan menggunakan rumus:

$$\frac{\text{Mean OD Kontrol} - \text{Mean OD Konsentrasi}}{\text{Mean OD kontrol (+)}} \times 100\%$$

Tabel 2 Presentase hambatan biofilm *Enterococcus faecalis*

Konsentrasi	Mean OD	Hambatan Biofilm %
13%	0	100%
12,25%	0,288	73,4%
11,5%	0,330	69,6%
10,75%	0,339	68,7%
10%	0,344	68,3%
9,25%	0,354	67,3%
8,5%	0,361	66,7%
7,75%	0,376	65,3%
7%	0,384	64,6%
6,25%	0,404	62,7%
Kontrol	1,084	0%

Berdasarkan data pada tabel di atas, dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 6,25%, ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) sudah dapat menghambat biofilm *Enterococcus faecalis* sebesar 62,7%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*), maka semakin tinggi hambatan biofilm. Hambatan biofilm pada konsentrasi 13% ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) yaitu sebesar 100%.

Hasil analisis data menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov*, menunjukkan data berdistribusi normal. Dilanjutkan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* didapatkan $p > 0,05$ yang berarti data homogen. Untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji *One-Way ANOVA*, diperoleh nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna antar kelompok konsentrasi. Dilanjutkan dengan tes *Post-Hoc Multiple Comparison* untuk mengetahui kelompok data mana yang memiliki perbedaan nilai OD biofilm yang bermakna. Hasil menunjukkan konsentrasi 13% ada perbedaan yang bermakna terhadap konsentrasi 11,50%, 10,75%, 10%, 9,25%, 8,50%, 7,75%, 7%, 6,25%, dan kelompok kontrol. Selain itu, konsentrasi 13%, 12,25%, 11,50%, 10,75%,

10%, 9,25%, 8,50%, 7,75%, 7%, 6,25%, juga ada perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol.

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi efektif ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) dalam menghambat biofilm *Enterococcus faecalis*. *Enterococcus faecalis* digunakan dalam penelitian ini karena bakteri tersebut paling banyak menyebabkan kegagalan perawatan saluran akar dan dapat membentuk biofilm sehingga sulit dieliminasi dalam saluran akar.

Penelitian terhadap biofilm *Enterococcus faecalis* ini dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode *microtiter plate assay* dengan *ELISA reader* untuk pembacaan *Optical Density*. Ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) didapat dari proses maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Pada penelitian pendahuluan didapatkan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) terhadap *Enterococcus faecalis*. Nilai KHM (6,25%) dan KBM (12,5%) diperlukan untuk menentukan *range* yang digunakan dalam penelitian agar dihasilkan *range* yang lebih sempit. Selain itu, dikarenakan warna ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) yang berwarna hijau kehitaman sehingga akan menyulitkan pembacaan OD apabila konsentrasi yang digunakan terlalu besar.

Hasil yang didapat menunjukkan bahwa semua nilai OD biofilm pada kelompok yang diberi perlakuan lebih rendah dari nilai OD kelompok kontrol. Semakin rendah nilai OD yang didapat, maka presentase penghambatan biofilm semakin besar. Pada konsentrasi dari 6,25% hingga 13% presentase penghambatan biofilm terus mengalami peningkatan. Adanya peningkatan presentase hambatan biofilm menggambarkan semakin banyak biofilm yang dapat dihambat sesuai dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*). Hal ini sesuai dengan teori bahwa ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) memiliki kemampuan dalam menghambat biofilm *Enterococcus faecalis*.

Pada konsentrasi 13% terjadi peningkatan penghambatan yang bermakna dibandingkan konsentrasi lainnya yaitu 12,25%, 11,50%, 10,75%, 10%, 9,25%, 8,50%, 7,75%, 7%, dan 6,25%, serta kontrol, yaitu sebesar 100%. Hal ini disebabkan karena konsentrasi 13% telah melewati Konsentrasi Bunuh Minimal dari ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* yakni sebesar 12,5%, sehingga dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari KBM, tidak ada bakteri yang dapat hidup.

Uji *Post-Hoc Multiple Comparison* menunjukkan bahwa konsentrasi 13% memiliki perbedaan yang bermakna dibandingkan konsentrasi 12,25%, 11,50%, 10,75%, 10%, 9,25%, 8,50%, 7,75%, 7%, dan 6,25% onontrol, sehingga membuktikan bahwa ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) pada konsentrasi 13% efektif dalam menghambat biofilm *Enterococcus faecalis*.

Penghambatan biofilm ini disebabkan karena ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) memiliki kandungan kimia antara lain, senyawa flavonoid, tanin, dan minyak atsiri, yang bekerja secara sinergis dalam merusak biofilm dan kemudian membunuh bakteri planktonik yang terlindungi membran biofilm, sehingga dapat menghambat pembentukan biofilm dengan efektif.¹¹

Senyawa flavonoid dapat mengganggu aktifitas enzim glikosiltransferase, bakteri, merusak *quorum sensing* bakteri atau *bacteria signaling*, serta mengganggu stabilitas struktur DNA helix ganda dan akan mempengaruhi semua proses pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Interaksi ini akan mengakibatkan kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom.^{13, 17, 18}

Senyawa tanin juga memperkuat fungsi antibiofilm dengan mengikat ion besi yang dibutuhkan bakteri untuk mempertahankan matriks biofilm sehingga viskositas bakteri menurun dan menyebabkan ikatan matriks biofilm akan berkurang.¹⁹Tanin memperkuat fungsi antibakteri dengan menginduksi pembentukan kompleks rantai hidrogen dan interaksi hidrofobik antara tanin dan protein. Apabila protein pada dinding sel rusak atau terdenaturasi, maka dinding sel bakteri akan mudah dimasuki oleh bahan kimia yang menyebabkan metabolisme bakteri terganggu.¹³

Minyak atsiri berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu

terbentuknya membran sel sehingga mengalami kerusakan atau tidak terbentuk secara sempurna. Kebocoran yang luas dari sel bakteri menyebabkan keluarnya molekul penting dan ion sehingga mengakibatkan kematian sel.²⁰

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi efektif ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum Wight*) terhadap hambatan biofilm *Enterococcus faecalis* adalah 13%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, and Owatz CB. 2006. *Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment*. Journal Endodontic. Vol. 32(2). p. 93-7.
2. Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, and Rutkunas V. 2008. *Microorganisms in Root Canal Infections : A Review*. Baltic Dental and Maxillofacial Journal. Vol. 10(1). p. 4-9.
3. Girard, P.L, Howard Ceri, Allan P. Gibb, Merle Olson, and Farshad Sepandj. 2010. *MIC Versus MBEC to Determine the Antibiotic Sensitivity of Staphylococcus aureus in Peritoneal Dialysis Peritonitis*. Journal of International Society for Peritoneal Dialysis. Vol. 30 (6). p. 652-6.
4. Hojo K, Nagaoka, Ohshima, and Maeda. 2009. *Bacterial interactions in dental biofilm development*. Journal of Dental Research. Vol.88(11). p 982-90.
5. Mohamed, A. J., and Huang, B.D. 2007. *Biofilm formation by enterococci*. Journal of Medical Microbiology. Vol. 56. p. 1581-8.
6. George, S., Kishen A, and Song K.P. 2011. *The Role of Environmental Changes in Monospecies Biofilm Formation on Root Canal by Enterococcus Faecalis*, Journal of Endodontics. Vol. 31 (12). p. 867-72.
7. Rhodes, J. S., 2006, *Advanced Endodontics Clinical Retreatment and Surgery*, Taylor and Francis Group, London. p. 130.
8. Saunders, W. 2005. *Lates Concepts in Root Canal Treatment*. British Dental Journal. Vol. 198 (8). p.515.
9. Ford, T. R. P. 2004. *Harty's Endodontics in Clinical Practice*. Elsevier Churchill Livingstone. p. 85-6.
10. Gomes, J.E., Aurelio, K.G., Costa, M.M.T., and Bernabe, P.F.E. 2008. *Comparison Of The Biocompatibility of Different Root*

- Canal Irrigants*. Journal Appliance Oral Science. Vol. 16(2). p. 137-44.
11. Studiawan, Herra, Santosa, dan Mulja Hadi. 2005. *Uji Aktivitas Penurun Kadar Glukosa Darah Ekstrak Daun Eugenia polyantha pada Mencit yang Diinduksi Aloksan*. Bagian Ilmu Bahan Alam, UNAIR. Media Kedokteran Hewan. Vol. 21(2). p. 62.
12. Utami P, dan Puspaningtyas DE. 2013. *The miracle of herbs*. Jakarta: AgroMedia Pustaka. p. 61-3.
13. Sumono A dan Wulan A. 2008. *The use of bay leaf (Eugenia polyantha Wight) in dentistry*. Dental Jurnal. Vol. 41(3). p. 147-50.
14. Dewanti, S., and Wahyudi, M.T. 2011. *Antibacteri Activity of Bay Leaf Infuse to Eschericia Coli In-Vitro*. Jurnal Medical Planta. Vol. 1(4). p. 79.
15. Lau K.Y, Zainin N.S, Abas F and Rukayadi Y. 2014. *Antibacterial and sporicidal activity of Eugenia polyantha Wight against Bacillus cereus and Bacillus subtilis*. International Journal Current Microbiology Appliance Science. Vol.3(12) p. 499-510.
16. Rahayu, D. 2015. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam Segar (Syzygium polyanthum [Wight] Walp) terhadap Pertumbuhan Enterococcus faecalis*. Universitas Syah Kuala.
17. Theilacker C, Sava I, Sanchez C.P., Bao Y., Kropec A., Grohmann E., Holst O., and Huebner J., 2011. *Deletion of the glycosyltransferase bgsB of Enterococcus faecalis leads to a complete loss of glycolipids from the cell membrane and to impaired biofilm formation*. Bio Medical Central Microbiology. p. 11-67.
18. Manner, S., Skogman, M., Goeres, D., Vuorela, P., and Fallarero, A., 2013. *Systematic Exploration of Natural and Synthetic Flavonoids for the Inhibition of Staphylococcus aureus Biofilms*. International Journal of Molecular Sciences. Vol 11. p.19434-51.
19. Metikasari, N. I., Mudjiono, dan M., Setyobudi,. 2015. *Efektivitas Antibiofilm Tanin Kulit Manggis Terhadap Bakteri Enterococcus faecalis*. Conservative Dentistry Journal. Vol 5. (1). p. 43-6.
20. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. 2006. *In vitro antibacterial activity of some plant essential oils*. BMC Complementary and Alternative Medicine, Vol. 6 (39). p. 1

