

POTENSI HAMBAT PERMEN LUNAK SIRIH DAN PINANG TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *Streptococcus mutans*

[*Inhibitory Potency of Betle and Catechu Chewy Candy on Streptococcus mutans Biofilm Formation*]

Maryati¹⁾, C. Hanny Wijaya^{2)*}, Dede R. Adawiyah²⁾, dan Boy M. Bachtiar³⁾

¹⁾ Program Studi Ilmu Pangan Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

²⁾ Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³⁾ Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia, Jakarta

Diterima 04 Mei 2017 / Disetujui 20 September 2017

ABSTRACT

Betle leaf (Piper betle L.) essential oil and catechu nut (Areca catechu L.) extracts have been known to be able to inhibit biofilm formation of S. mutans. This research aimed to characterize the chemical compounds of betle leaf essential oil, screen the phytochemicals in catechu nut ethanol extract, and assess the inhibitory potential of betle and catechu in chewy candy on biofilm formation by S. mutans. The experiment included preparation of extracts and chemical characterization of the raw materials, formulation of chewy candy, measurement of biofilm inhibition, and sensory evaluation of the candy. In vitro examination for inhibitory potency of betle and catechu chewy candy against biofilm formation S. mutans ATCC 31987 was performed in adhesion phase (4 hours) and active accumulation phase (18 hours). Antibacterial assay was performed in BHI broth media on microplate 96 wells. Crystal violet 0.5% was used to stain the biofilm and Optical Density (OD) was measured at λ 450 nm. The GC-MS analysis detected 32 compounds in the essential oil of betle leaf. The Betle leaf essential oil contained chavicol acetate, isoeugenol, chavibetol acetate, chavicol, and allylcatechol 3.4-diacetate, while catechu nut ethanol extract contained flavonoids and tannins. The components were possibly the inhibitory agents of S. mutans biofilm formation. Chewy candy containing 0.8% betle leaf essential oil and 2.3% catechu nut extract had effective inhibitory potential for S. mutans biofilm formation. Inhibition during adhesion phase was $74.5 \pm 0.7\%$, while that for accumulation phase was $60.8 \pm 1.8\%$. Sensory analysis suggests that the candy was slightly liked by the panelists (5 ± 2).

Keywords: *Areca catechu L., biofilm, chewy candy, Piper betle L., Streptococcus mutans*

ABSTRAK

Minyak atsiri daun sirih (*Piper betle L.*) dan ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) diketahui dapat menghambat pembentukan biofilm *S. mutans*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi komponen kimia minyak atsiri daun sirih, menskrining fitokimia ekstrak etanol biji pinang, dan mengukur potensi hambat permen lunak yang mengandung minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang terhadap pembentukan biofilm *S. mutans*. Penelitian ini meliputi penyiapan bahan baku, karakterisasi kimia bahan baku, pembuatan permen lunak sirih dan pinang, pengukuran penghambatan biofilm, dan evaluasi sensori permen. Uji potensi hambat permen lunak sirih dan pinang terhadap pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 31987 dilakukan pada fase adesi (4 jam) dan fase akumulasi aktif (18 jam) secara *in vitro*. Pengujian antibakteri dilakukan pada media BHI *Broth*, menggunakan *microplate* 96 sumur. Kristal violet 0,5% digunakan untuk pewarnaan biofilm, sedangkan *Optical Density* (OD) sampel diukur pada λ 450 nm. Analisis GC-MS menunjukkan 32 komponen terdeteksi dalam minyak atsiri daun sirih. Minyak atsiri daun sirih yang digunakan mengandung kavikol asetat, isoeugenol, kavibetol asetat, kavikol, dan alilkatekol 3,4-diasetat, sedangkan ekstrak etanol biji pinang mengandung flavonoid dan tanin. Komponen-komponen tersebut diduga berperan sebagai agen penghambat pembentukan biofilm *S. mutans*. Permen lunak yang mengandung minyak atsiri daun sirih 0,8% dan ekstrak biji pinang 2,3% memiliki potensi hambat yang efektif terhadap pembentukan biofilm *S. mutans*. Penghambatan selama fase adesi adalah $74,5 \pm 0,7\%$, sedangkan fase akumulasi adalah $60,8 \pm 1,8\%$. Analisis sensori menyarankan bahwa permen agak disukai oleh panelis (5 ± 2).

Kata kunci: *Areca catechu L., biofilm, permen lunak, Piper betle L., Streptococcus mutans*

*Penulis Korespondensi: E-mail: hazemi@indo.net.id

PENDAHULUAN

Kebiasaan mengunyah sirih dan pinang merupakan bagian dari kebudayaan masyarakat Indonesia. Salah satu daerah di Indonesia yang hampir sebagian besar masyarakatnya telah mengunyah sirih dan pinang adalah Papua (Hamzuri dan Siregar, 1997). Menyirih dan menginang adalah istilah yang dipakai untuk meramu campuran biji pinang dengan unsur-unsur terpilih yang dibungkus dengan daun sirih (Peng *et al.*, 2015). Kebiasaan mengunyah sirih dan pinang mengakibatkan gigi menjadi kuat meskipun telah usia lanjut (Parianti *et al.*, 2015). Salah satu alternatif mengunyah sirih dan pinang yang lebih praktis yaitu dibuat dalam produk pangan. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Buckle *et al.* (1987) bahwa salah satu produk praktis dan disukai hampir semua golongan usia adalah permen, baik dalam bentuk keras maupun lunak. Kandungan minyak atsiri daun sirih dilaporkan dapat menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* (Rahim dan Nalina, 2011). Selain itu, ekstrak biji pinang telah dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pembentukan biofilm *S. mutans* (Reena dan Michael, 2009). Biofilm atau plak gigi merupakan akumulasi sel bakteri dalam matriks ekstraseluler yang menempel pada permukaan gigi atau restorasi gigi (Ren *et al.*, 2015). *S. mutans* merupakan agen utama dalam patogenesis karies gigi (Zhao *et al.*, 2014).

Senyawa fenolik dalam minyak atsiri daun sirih yang berperan sebagai antimikroba oral anaerob adalah senyawa alilpirokatekol (Ramji *et al.*, 2002). Senyawa kavikol, hidrosikavikol, kavibetol asetat, eugenol, isoeugenol, safrol, dan alilpirokatekol monoasetat merupakan konstituen fenolik minyak atsiri daun sirih yang diduga berperan sebagai agen penghambat pembentukan biofilm *S. mutans* (Suliantari *et al.*, 2008; Sugumaran *et al.*, 2011). Komponen utama ekstrak biji pinang adalah senyawa leukosinaindin (flavan 3,4-diol) dan prosianidin (Mathew dan Govindarajan, 1963; Huang *et al.*, 2010). Reena dan Michael (2009) melaporkan bahwa ekstrak biji pinang terbukti dapat menghambat pembentukan biofilm *S. mutans*. Senyawa yang diduga berperan sebagai agen antibiofilm *S. mutans* adalah flavan 3,4-diol dan prosianidin. Minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang masing-masing memiliki senyawa antimikroba. Menurut Ouedrhiri *et al.* (2016), zat antimikroba jika digunakan dalam bentuk kombinasi memiliki beberapa keuntungan yaitu melalui efek sinergisme atau adisi, mengurangi kemungkinan terjadinya resistensi selain dapat meningkatkan efektivitas penghambatan, terutama jika kedua zat tersebut memiliki aksi yang berbeda tetapi saling mendukung. Kombinasi minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang belum dilaporkan dalam menghambat biofilm *S. mutans*. Campuran minyak atsiri

daun sirih dan ekstrak biji pinang dalam sediaan permen lunak diharapkan memiliki efek sinergis dalam menghambat biofilm *S. mutans*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan potensi hambat permen lunak yang mengandung kombinasi minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang terhadap pembentukan biofilm *S. mutans*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Minyak atsiri daun sirih komersial diperoleh dari PT. Sumber Multi Atsiri (Cianjur, Jawa Barat), biji pinang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat Cimanggu bagian Kawasan Wisata Ilmiah (Bogor, Jawa Barat), maltitol (PT. Astabumi Ciptadaya, Jakarta), isomalt (Mannheim, Germany), gum arab (Houjin, Cina), *S. mutans* ATCC 31987 diperoleh dari laboratorium Biologi Oral FKG UI.

Ekstraksi biji pinang

Biji pinang diambil pada saat buah matang, kulit buah berwarna merah kecoklatan dan konsistensi buah yang keras. Pembuatan tepung dilakukan melalui pengecilan ukuran, pengeringan, dan penggilingan. Biji pinang diolah menjadi tepung sesuai metode Awe *et al.* (2013) dengan modifikasi. Biji pinang dikeringkan dengan *cabinet dryer* (Engineering & Equipment GmbH 6072 Dreieich, West Germany) pada suhu 50°C selama 5 jam, lalu digiling dengan *disc mill* melalui saringan 420 µm.

Tepung biji pinang diekstraksi dengan metode *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) sesuai Chavan dan Singhal (2013) dengan modifikasi. Serbuk biji pinang dilarutkan dengan etanol *food grade* 96% (produksi lokal, Bogor) dengan perbandingan 1:6 w/v, kemudian dilakukan *shaker* (Infors AG Rittergasse 27 CH-4103 type RC TK, Bottmingen) dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang selama 30 menit. Setelah dilakukan *shaker* dilanjutkan sonikasi pada frekuensi 44 kHz dan 925 W selama 30 menit (Branson 8510 USA). Ekstrak direndam dalam *ice bath* untuk mengimbangi panas selama sonikasi. Ini dipertahankan pada suhu ekstrak 30°C. Proses ekstraksi ini dilakukan dua kali. Ekstrak yang diperoleh dari sentrifugasi (Hermle Z 383 K, Germany) dengan kecepatan 5000 rpm selama 50 menit pada suhu 25°C, dan disaring dengan pompa vakum (Buchi B-169 Labortechnik, Zwitserland) menggunakan kertas saring Whatman No. 1 (Merck Milipore, Germany). Supernatan dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* (Buchi R-210 Labortechnik, Zwitserland) pada suhu 40°C sampai 1/8 volume awal. Selanjutnya, hasil ekstrak biji pinang disimpan dalam botol berwarna gelap pada suhu 4°C.

Analisis komponen kimia minyak atsiri daun sirih

Komponen kimia minyak atsiri daun sirih dianalisis menggunakan GC-MS berdasarkan metode Santos *et al.* (2009) yang dimodifikasi. Sistem GC-MS (model *Agilent Technologies 7890A-5975C inert XLEI/CI MSD*, USA) dilengkapi dengan kolom kapiler yang terdiri 5% fenil - 95% metilpolisiloksan (non polar HP-5) (Panjang 60 m, diameter 0,25 mm, ketebalan 0,25 μm). Helium sebagai gas pembawa dengan tekanan 100 Kpa dan laju alir 1 mL/menit. Minyak atsiri daun sirih sebanyak 0,2 μL diinjeksi dengan teknik split. Aliran split dengan rasio adalah 1:100. Suhu injektor 250°C dan suhu detektor 280°C. Suhu awal kolom 60°C ditahan selama 5 menit. Laju kenaikan suhu kolom 3°C/menit hingga suhu mencapai 250°C, dan ditahan selama 10 menit. Detektor MS dengan kisaran rasio massa dan muatan 33 m/z-550 m/z. Energi ionisasi MS sebesar 70 eV. Identifikasi masing-masing komponen dengan membandingkan pola fragmen massa dengan komponen yang tersedia dalam data base Wiley 9 N11L dan Adams 1995.

Skrining fitokimia

Ekstrak etanol biji pinang dilakukan skrining fitokimia sesuai metode Harborne (1998) yang dimodifikasi yaitu untuk menentukan keberadaan metabolit sekunder diantaranya alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, hidrokuinon, triterpenoid, dan steroid. Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan 1 g sampel dalam beberapa tetes NH_3 (Merck Milipore, Germany, kemudian ditambahkan 5 mL kloroform (Merck & Co, New Jersey, USA) dan disaring, Filtrat ditambah dengan 3-5 tetes H_2SO_4 2 M (Merck, Germany) sampai terbentuk dua lapisan. Diambil lapisan asam (terdapat bagian atas) dan direaksikan dengan pereaksi *Dragendorf* (Merck Milipore, Germany), *Mayer* (Merck Milipore, Germany), dan *Wager* (Merck Milipore, Germany). Jika terbentuk endapan jingga pada reagen *Dragendorf*, endapan putih pada reagen *Mayer*, dan endapan coklat pada reagen *Wagner* berarti sampel mengandung komponen alkaloid.

Uji flavonoid dilakukan dengan melarutkan 5 g sampel dalam 100 mL air suling yang dipanaskan 5 menit dan kemudian disaring. Filtrat kemudian ditambah 0,05 mg serbuk Mg (Merck Milipore, Germany), 1 mL HCl pekat (Merck Milipore, Germany), dan 1 mL alkohol (Merck Milipore, Germany), kemudian dikocok kuat-kuat. Jika lapisan tersebut berwarna merah, kuning atau jingga maka dalam sampel tersebut terdapat komponen flavonoid. Uji saponin dilakukan dengan melarutkan 5 g sampel dalam air suling yang dipanaskan 5 menit kemudian disaring. Filtrat yang telah dihasilkan kemudian dikocok dengan kuat sampai terbentuk buih. Jika buih

yang terbentuk stabil maka ekstrak tersebut mengandung saponin.

Uji tanin dilakukan dengan melarutkan 5 g sampel dalam air suling yang dipanaskan 5 menit dan kemudian disaring. Filtrat yang telah dihasilkan kemudian ditambah 3 tetes FeCl_3 1% (Merck Milipore, Germany). Jika terbentuk warna hitam kehijauan berarti ekstrak mengandung tanin. Uji hidrokuinon dilakukan dengan melarutkan 1 g sampel dalam metanol (Merck Milipore, Germany) kemudian disaring. Filtrat yang dihasilkan kemudian diberi NaOH 10% (Merck Milipore, Germany) beberapa tetes. Jika terbentuk warna merah berarti sampel mengandung hidrokuinon. Uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan melarutkan 5 g sampel dalam 20 mL n-heksana (JT Baker USA) dan didiamkan selama 2 jam. Setelah itu, campuran dikocok dan selanjutnya disaring. Kemudian filtrat ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 pekat (Merck Milipore, Germany). Jika terbentuk warna biru atau hijau berarti ekstrak mengandung steroid. Setelah itu ditambah 1 tetes CH_3COOH anhidrat (Merck Milipore, Germany), jika terbentuk warna merah atau ungu berarti ekstrak mengandung triterpenoid.

Pembuatan permen lunak sirih dan pinang

Pembuatan permen lunak sirih dan pinang menggunakan formula *cajuput chewy candy non sukrosa* yang dimodifikasi (Dewi, 2014). Komposisi formula permen lunak sirih dan pinang per 100 g (Tabel 1). Tahap pertama yaitu pembuatan maltitol sirup. Maltitol sebanyak 75 g dilarutkan dalam 100 mL air kemudian dididihkan hingga semuanya larut. Tahap kedua yaitu dilakukan pencampuran isomalt, maltitol sirup, gum arab, maltodekstrin (toko Setia Guna, Bogor), sukralosa (toko yoek's, Bogor), dan air kemudian dididihkan hingga mencapai suhu 136°C. Untuk pencampuran minyak kanola, gliserol monostearat, dan lesitin (toko Yoek's, Bogor) suhu diturunkan hingga suhu 110°C. Penambahan minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang (Tabel 2) dilakukan ketika suhu telah turun hingga 40°C. Setelah itu, dilakukan penarikan dan pelipatan adonan hingga tercapai adonan permen yang liat.

Batas minimum konsentrasi minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang berdasarkan konsentrasi hambat minimum *S. mutans*. Batas minimum mengacu hasil penelitian Yunilawati (2002), minyak daun sirih pada pasta gigi memiliki konsentrasi hambat minimum 0,1% terhadap *S. mutans*. Hasil penelitian Asdyakasa (2013), konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol biji pinang sebesar 1,5% dalam menghambat *S. mutans*. Konsentrasi ekstrak biji pinang cukup tinggi dibandingkan dengan minyak daun sirih. Penentuan batas minimum ekstrak biji pinang sama dengan minyak daun sirih sebesar 0,1% untuk mengetahui konsentrasi yang mempunyai efek sinergis dalam menghambat *S. mutans*.

Batas maksimum konsentrasi minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang berdasarkan penerimaan sensori. Hal ini disebabkan konsentrasi minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang yang tinggi diduga penerimaan sensori akan menurun. Menurut Sugumaran *et al.* (2011) bahwa minyak atsiri daun sirih mempunyai rasa *pungent* (pahit agak pedas), sedangkan menurut Peng *et al.* (2015), ekstrak biji pinang mempunyai rasa *astringent* (kelat agak sepat). Konsentrasi maksimum minyak atsiri dan ekstrak biji pinang yang dapat diterima secara sensori dengan atribut rasa adalah 3% (v/v). Panelis yang digunakan adalah mahasiswa/i IPB yang terbiasa mengunyah sirih dan pinang.

Tabel 1. Formula permen lunak sirih dan pinang per 100 g

Bahan	Persen (%)
Isomalt	32,8 (w/v)
Maltitol sirup (75%)	47,75 (v/v)
Gum arab	1,45 (w/v)
Maltodekstrin	2,25 (w/v)
Sukralosa	0,01 (w/v)
Air	6,04 (v/v)
Fat (minyak kanola)	5,9 (v/v)
Lesitin	0,4 (v/v)
Gliserol monostearat	0,3 (v/v)
Flavor minyak atsiri daun sirih	x (v/v)
Flavor ekstrak biji pinang	y (v/v)

Sumber: Dewi (2014)

Uji penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 31987

Uji penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* sesuai metode Dwivedi dan Singh (2016) yang meliputi persiapan kultur *S. mutans*, penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans*, dan pewarnaan kristal violet. *S. mutans* diambil 10 µL menggunakan pipet mikro (Eppendorf) dari stok kultur bakteri yang disimpan dalam lemari pendingin (-80°C). Kemudian ditumbuhkan dalam BHI agar (Acumedia, USA) dan diinkubasi (Memmert IN55, Germany) selama 48 jam pada suhu 37°C dengan kondisi mikroaerofilik (CO₂ 10%, H₂ 10%, N₂ 80%) di dalam anaerobik jar. Setelah itu, diambil masing-masing 1 ose *S. mutans* dari 2 koloni berbeda dan ditumbuhkan dalam BHI *broth* (Acumedia, USA). Selanjutnya diinkubasi kembali 24 jam pada suhu 37°C dengan atmosfer mikroaerofilik. Penentuan jumlah bakteri menggunakan *Total Plate Count* (TPC). Setelah diketahui konsentrasi awal *S. mutans* yang telah dibiakkan, selanjutnya disera-gamkan menjadi 10⁷ CFU/mL.

Saliva disterilkan menggunakan filter (0,22 µm, Millipore, Bedford, MA) dituangkan ke dalam *microplate* dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya saliva steril sebanyak 100 µL (100 ng/mL) dimasukkan ke dalam *microplate 96 well* (Iwaki, Japan) dan

diinkubasi selama 30 menit, kemudian saliva di-buang. Kemudian dimasukkan ke dalam *well* yang telah dilapisi protein saliva secara bersamaan 100 µL *S. mutans* (10⁷ CFU/mL) dan 100 µL formula uji (permen lunak sirih dan pinang dengan konsentrasi pada Tabel 2) yang telah dilarutkan dalam BHI *broth* (1:2 g/mL). Selanjutnya, waktu inkubasi biofilm dilakukan menurut Suwandi *et al.* (2013) dengan sedikit modifikasi yaitu periode inkubasi ditetapkan selama 4 jam (fase adesi) dan 18 jam (fase akumulasi aktif/prematurasi) pada suhu 37°C dengan kondisi mikroaerofilik.

Tabel 2. Konsentrasi minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang dalam permen

Formula	MDS* (% v/v)	EBP** (% v/v)
F1	0,1	3,0
F2	0,8	2,3
F3	1,6	1,5
F4	3,0	0,1

Keterangan: *MDS, minyak atsiri daun sirih; **EBP ekstrak biji pinang

Setelah inkubasi, semua cairan dalam *well* dibuang hingga di dasar *well* hanya menempel biofilm. Selanjutnya, *well* dicuci 2 kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Merck Milipore, Germany) masing-masing sebanyak 200 µL, kemudian difiksasi dengan cara melewatkan *well* beberapa saat di atas lampu Bunsen. *Well* yang diinokulasikan dengan bakteri, tanpa bahan uji, diperlakukan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya *well* yang telah difiksasi ditambahkan 200 µL kristal violet 0,5% (Pronadisa, Spain), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah itu, cairan di dalam *well* dibuang kemudian dibilas dua kali dengan PBS steril 200 µL untuk menghilangkan warna yang tidak terserap sedangkan warna yang terikat dari pewarnaan sel diekstraksi 200 µL etanol 95% (Merck Milipore, Germany). Pengujian semi kuantitatif pembentukan biofilm *S. mutans* diukur absorbansi larutan dengan menggunakan *microplate reader* (Accu Reader M-965 Elisa Reader, Taiwan) pada panjang gelombang 450 nm (OD₄₅₀). Persentase daya hambat dan potensi hambat pada fase adesi dan akumulasi pembentukan biofilm *S. mutans* menggunakan rumus:

Persentase daya hambat =

$$\frac{\text{OD Kontrol negatif} - \text{OD perlakuan}}{\text{OD Kontrol negatif}} \times 100\%$$

Persentase potensi hambat =

$$\frac{\text{Persentase daya hambat perlakuan}}{\text{Persentase daya hambat kontrol positif}} \times 100\%$$

di mana, *kontrol positif menggunakan klorheksidin diglukonat 0,06% pada *S. mutans* 25175 dengan

persentase daya hambat 100% (D'Angelis *et al.*, 2012).

Persentase daya hambat perlakuan pada fase adesi dan akumulasi masing-masing dibandingkan dengan persentase daya hambat kontrol negatif (BHI broth dan *S. mutans*) yaitu 0%. Sedangkan persentase potensi hambat perlakuan pada fase adesi dan akumulasi masing-masing dibandingkan dengan potensi hambat kontrol positif (klorheksidin diglukonat) yaitu 100%.

Evaluasi sensori

Penerimaan sensori permen lunak sirih dan pinang berdasarkan atribut rasa dengan menggunakan skala hedonik tujuh poin dimana, 1=sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = antara suka/tidak suka, 5 = agak suka, 6 = suka, dan 7 = sangat suka (Meilgaard *et al.*, 2006). Panelis yang digunakan dalam penelitian adalah panelis yang terbiasa mengunyah sirih dan pinang sebanyak 78 orang yang berasal dari Kabupaten Biak, Papua.

Analisis data

Pengolahan statistik menggunakan RAL Faktorial dengan uji *one-way* ANOVA dan uji lanjut Duncan ($P < 0,05$) menggunakan *software* SPSS 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komponen kimia minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* L.)

Komponen kimia minyak atsiri daun sirih hasil pendugaan GC-MS sebanyak 32 senyawa tersaji pada Tabel 3. Senyawa fenolik yang terdeteksi antara lain adalah kavikol asetat, isoeugenol, kavibetol asetat, kavikol, dan alilcatekol 3,4-diasetat (Gambar 1), senyawa-senyawa yang diduga berperan aktif dalam menghambat pembentukan biofilm *S. mutans*. Suliantari *et al.* (2008), Rahim dan Nalina (2011) melaporkan bahwa senyawa fenolik yang terkandung dalam minyak atsiri daun sirih diantaranya kavikol, hidroksikavikol, kavibetol asetat, eugenol, isoeugenol, safrol, dan alilpirokatekol monoasetat diduga berperan sebagai agen penghambat pembentukan biofilm *S. mutans*.

Komponen kimia ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.)

Skrining fitokimia digunakan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol biji pinang. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol biji pinang (Tabel 4) mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, hidrokuinon, dan triterpenoid. Komponen utama pada ekstrak etanol biji pinang adalah senyawa flavonoid (flavan 3,4-

diol) dan tanin terkondensasi (prosyaniidin) (Mathew dan Govindarajan, 1963; Huang *et al.*, 2010). Reena dan Michael (2009) juga melaporkan ekstrak biji pinang terbukti dapat menghambat pembentukan biofilm *S. mutans*. Senyawa yang diduga berperan dalam penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* adalah flavan 3,4-diol dan prosyaniidin.

Tabel 3. Senyawa kimia minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* L.)

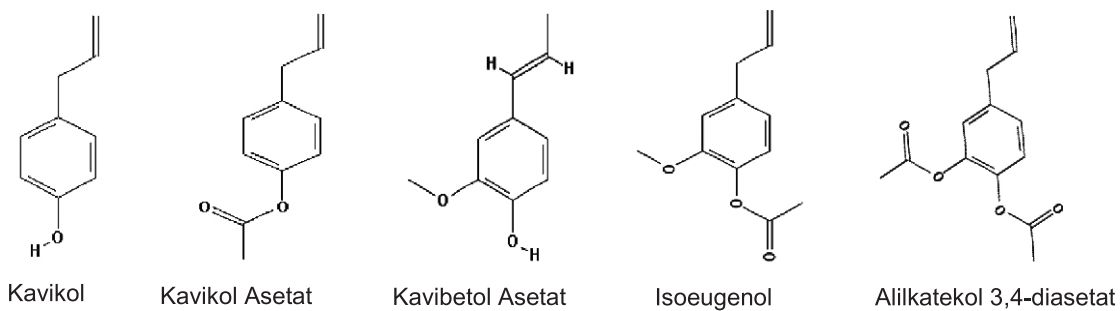
No. Peak	Waktu Retensi*	Komponen
1	26,885	<i>α-thujene</i>
2	27,414	<i>α-pinene</i>
3	28,337	<i>Camphene</i>
4	29,500	<i>Sabinene</i>
5	30,077	<i>β-myrcene</i>
6	31,799	<i>α-terpinene</i>
7	32,212	<i>p-simen</i>
8	32,597	<i>β-phellandrene</i>
9	34,000	<i>γ-terpinene</i>
10	35,635	<i>α-terpinolene</i>
11	35,895	<i>Linalool L</i>
12	40,347	<i>4-terpineol</i>
13	41,173	<i>Estragol</i>
14	43,443	<i>Chavicol</i>
15	47,923	<i>Chavicol acetate</i>
16	49,183	<i>Isoeugenol</i>
17	49,702	<i>α-copaene</i>
18	50,202	<i>β-elemene</i>
19	51,039	<i>α-bergamotene</i>
20	51,327	<i>Nortricyclane</i>
21	51,760	<i>t-caryophyllene</i>
22	53,135	<i>β-selinene</i>
23	53,760	<i>γ-murolene</i>
24	54,202	<i>Tricyclo[4,1,0,0(2,4)]heptanes</i>
25	54,471	<i>Naphthalene</i>
26	54,760	<i>α-selinene</i>
27	55,154	<i>Chavibetol acetate</i>
28	55,452	<i>δ-cadinene</i>
29	55,664	<i>7-epi-α-selinene</i>
30	58,241	<i>Caryophyllene oxide</i>
31	59,173	<i>2-methylbicyclo [3,3,1] nonane</i>
32	59,395	<i>Allylcatechol 3,4-diacetate</i>

Keterangan: *Waktu retensi (menit) dengan menggunakan kolom kapiler HP-5

Tabel 4. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu* L.)

Konstituen Fitokimia	Ekstrak Etanol
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Tanin	+
Hidrokuinon	+
Triterpenoid	+
Steroid	-

Keterangan: + indikasi ada dalam konstituen; - indikasi tidak ada dalam konstituen

Gambar 1. Senyawa kimia minyak atsiri daun sirih yang diduga sebagai agen antibiofilm *S. mutans*

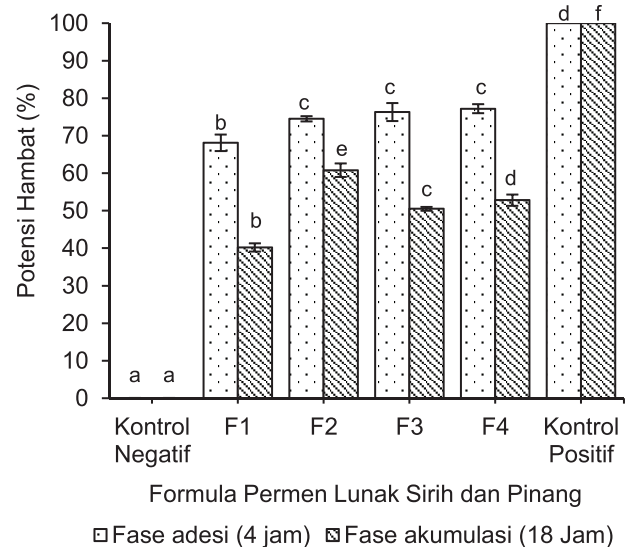
Potensi hambat pembentukan biofilm *S. mutans* (fase adesi dan akumulasi)

Tahap pembentukan biofilm terdiri dari fase perlekatan, fase kolonisasi bakteri pionir, koagregasi, dan maturasi (Neilands, 2007). Pada penelitian ini, pelikel disimulasikan dengan cara melapisi permukaan *well* dgn protein saliva, sehingga memungkinkan *S. mutans* melekat (fase adesi dan akumulasi) pada permukaan *well*.

Potensi hambat fase adesi pembentukan biofilm *S. mutans* yang efektif (Gambar 2) ditunjukkan oleh formula 4 (minyak atsiri daun sirih 3,0% dan ekstrak biji pinang 0,1%) dengan potensi hambat sebesar $77,2 \pm 1,2\%$. Hal ini tidak berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan formula 3 (minyak atsiri daun sirih 1,6% dan ekstrak biji pinang 1,5%) dengan potensi hambat sebesar $76,3 \pm 2,4\%$ dan formula 2 (minyak atsiri daun sirih 0,8% dan ekstrak biji pinang 2,3%) dengan potensi hambat sebesar $74,5\% \pm 0,7\%$. Pada formula 4 dan formula 3 mengandung minyak atsiri daun sirih dengan konsentrasi tinggi sehingga memiliki penghambatan yang efektif. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Rahim dan Nalina (2011) dimana konsentrasi minyak atsiri daun sirih yang semakin tinggi maka penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* juga semakin efektif. Pada formula 2 diduga terjadi interaksi senyawa bioaktif dari minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang dalam menghambat pembentukan adesi biofilm *S. mutans*. Hal ini sesuai dengan penelitian Goñi *et al.* (2009) yang menunjukkan bahwa mekanisme antibakteri dari 1,8-sineol dan kamphor pada kayu manis sinergis dengan aktivitas eugenol pada minyak atsiri cengkeh.

Pada fase akumulasi terjadi peningkatan jumlah pembentukan biofilm *S. mutans* yang ditunjukkan dengan daya hambatnya kurang baik dibandingkan fase adesi (Gambar 2). Fenomena ini mungkin disebabkan pada fase adesi pembentukan biofilm *S. mutans* yaitu massa biofilm yang dihasilkan masih sangat lemah sehingga pelekatan massa biofilm pada permukaan *multiwell plate* dapat dihambat. Menurut Beckers dan Hoeven (1982), pada awal fase log biofilm masih lemah. Sejalan yang dilaporkan oleh Patel *et al.* (2009) bahwa penghambatan

lebih awal lebih penting dibandingkan penurunan maturasi biofilm. Senyawa bioaktif minyak atsiri daun sirih dan ekstrak biji pinang diduga pada fase adesi mudah berpenetrasi ke dalam matriks biofilm sedangkan pada fase akumulasi sulit berpenetrasi ke dalam matriks biofilm. Selain itu, potensi hambat pada fase akumulasi kurang efektif disebabkan pengukuran paparan isomalt adalah selama 18 jam. Menurut Mayo dan Ritchie (2009), isomalt yang terdapat dalam permen sirih pinang dapat didegradasi oleh enzim α -glukosidase *S. mutans* menjadi glukosa, manitol, dan sorbitol sebagai sumber nutrisi bila paparan dalam periode panjang.



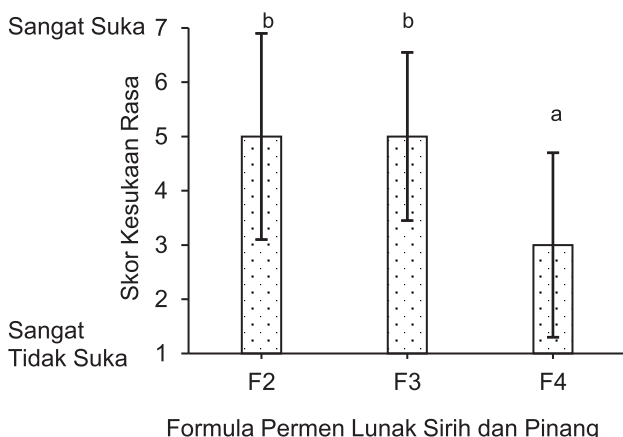
Keterangan: F1 (MDS 0,1% v/v, EBP 3,0% v/v); F2 (MDS 0,8% v/v, EBP 2,3% v/v); F3 (MDS 1,6% v/v, EBP 1,5% v/v); F4 (MDS 3,0% v/v, EBP 0,1% v/v); MDS (minyak atsiri daun sirih); EBP (ekstrak biji pinang); Kontrol negatif (BHI broth dan *S. mutans*); Kontrol positif (klorheksidin diglukonat); Uji penghambatan biofilm (n = 3); Notasi huruf pada diagram yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji selang berganda Duncan)

Gambar 2. Hasil pengukuran respon potensi hambat permen lunak sirih dan pinang terhadap pembentukan biofilm *S. mutans*

Mekanisme penghambatan minyak atsiri daun sirih terhadap pembentukan biofilm *S. mutans* yaitu sifat hidrofobitasnya yang masuk ke dalam lapisan lipida sel bakteri sehingga sel bakteri menjadi permeabel yang memicu koagulasi membran sitoplasma, kebocoran ion, ketidakseimbangan transpor aktif, dan kerusakan konstituen lainnya (Leite *et al.*, 2007). Mekanisme lain dalam penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* yaitu adanya senyawa flavonoid dari ekstrak biji pinang yang berikatan dengan kompleks protein ekstraseluler bakteri sehingga melisis dinding sel. Selain itu, senyawa tanin dari ekstrak biji pinang juga berperan dalam menghambat enzim ekstraseluler dan fosforilasi oksidatif *S. mutans* (Boussaada *et al.*, 2008).

Skor sensori (kesukaan rasa)

Uji kesukaan rasa formula permen sirih pinang berdasarkan potensi hambat yang efektif terhadap pembentukan biofilm *S. mutans* (Gambar 3). Formula permen yang tidak berbeda nyata memiliki potensi hambat baik pada fase adesi adalah formula 2, formula 3, dan formula 4 ($P>0,05$). Namun, formula 2 memiliki potensi hambat paling baik pada fase akumulasi dibandingkan formula 3 dan formula 4 ($P<0,05$).



Formula Permen Lunak Sirih dan Pinang

Keterangan: F2 (MDS 0,8% v/v, EBP 2,3% v/v); F3 (MDS 1,6% v/v, EBP 1,5% v/v); F4 (MDS 3,0% v/v, EBP 0,1% v/v); MDS (minyak atsiri daun sirih); EBP (ekstrak biji pinang); uji penerimaan rasa (n= 78); Notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5% (uji selang berganda Duncan)

Gambar 3. Penerimaan rasa formula permen lunak sirih dan pinang

Hasil analisis kesukaan rasa menunjukkan bahwa formula 4 memiliki rata-rata skor paling rendah (3 = agak tidak suka) yang berbeda nyata dengan formula 2 dan formula 3 ($P<0,05$). Hal ini diduga disebabkan penambahan minyak atsiri daun sirih memberikan rasa *pungent* yaitu pahit agak

pedas (Sugumaran *et al.*, 2011) dan penambahan ekstrak biji pinang yang juga mempunyai rasa *astringent* yaitu pahit agak sepat (Peng *et al.*, 2015). Formula 2 dan formula 3 sebenarnya memiliki rasa yang sama (5 = agak suka), namun formula 2 memiliki potensi hambat akumulasi yang lebih baik dibandingkan dengan formula 3.

KESIMPULAN

Minyak atsiri daun sirih yang digunakan terdeteksi mengandung kavikol asetat, isoeugenol, kavibetol asetat, kavikol, dan alilkatekol 3,4-diasetat sedangkan ekstrak etanol biji pinang mengandung flavonoid dan tanin, senyawa-senyawa yang diduga berperan sebagai agen penghambat pembentukan biofilm *S. mutans*. Permen lunak yang mengandung campuran minyak atsiri daun sirih 0,8% dan ekstrak biji pinang 2,3% memiliki potensi hambat yang efektif terhadap pembentukan biofilm *S. mutans* (terutama pada fase adesi 74,5±0,7%, fase akumulasi 60,8±1,8%) dengan penerimaan sensori rasa agak disukai (5±2). Permen lunak sirih dan pinang perlu diuji lanjut secara *in vivo* terhadap penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* sehingga dapat diketahui relevansi lama konsumsi permen sirih dan pinang dengan keefektifan potensi hambat selama 4 jam hingga 18 jam secara *in vitro*. Optimalisasi formula lebih lanjut direkomendasikan untuk dilakukan guna meningkatkan penerimaan sensori.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Pengelolaan Dana Pendidikan (LPDP) atas dana pendidikan dan penelitian serta Laboratorium Biologi Oral FKG UI atas bantuan dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams RP. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 405. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- Asdyakasa H. 2013. Efektivitas ekstrak etanol biji pinang (*eca catechu* Linn) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Naskah Publikasi. Jawa Tengah: Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya.
- Awe BF, Fagbemi NT, Ifesan BOT, Badejo AA. 2013. Antioxidant properties of cold and hot water extracts of cocoa, Hibiscus flower extract, and ginger beverage blends. Food Res Int 52: 490-495. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.021.

- Beckers HJA, van der Hoeven JS. 1982. Growth rates of actinomyces viscosus and *Streptococcus mutans* during early colonization of tooth surfaces in Gnotobiotic rats. *Inf Hummanity* 35: 583-587.
- Boussaada O, Chriaa J, Nabli, R Ammar S, Saidana D, Mahjoub MA, Chraef L, Helal AN. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extracts of *evax pyfmea* (*Asteraceae*) growing wild in Tunisia. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 1289-1296. DOI: 10.1007/s11274-007-9600-7.
- Buckle KA, Edwards RA, Fleet GH, Wooton M. 1978. *A Course Manual in Food Science*. 365. Watson Ferguson & Cob, Brisbane.
- Chavan Y, Singhal SR. 2013. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive from arecanut (*Areca catechu* L) and optimization study using response surface methodology. *Innov Food Sci Emerg Tech* 17: 106-113. DOI: 10.1016/j.ifset.2012.10.001.
- D'Angelis CEM, Leite MF, Sousa JPB, Alonso L, Polizello ACM, Groppo M, Aires CP, Bastos JK, Spadaro ACC. 2012. Inhibiting effect of *Dorsitenia asaroides* extracts on cariogenic properties of *Streptococcus mutans*. *Anaerobe* 18: 31-36. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.12.020 .
- Dewi YK. 2014. Formulation of Non-sucrose *Cajuputs* Soft Candy Added with Fruits Flavor Accepted by Children [Thesis]. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Pelita Harapan, Tangerang.
- Dwivedi D, Singh V. 2016. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. *J Tradit Complem Med* 6: 57-61. DOI: 10.1016/j.jtcm.2014.11.025.
- Goñi P, López P, Sánchez C, Gómez-Lus R, Becerril R, Nerín C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem* 116: 982-989. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.03.058.
- Hamzuri MH, TR Siregar. 1997. Budaya Menginang di Daerah Irian Jaya, Maluku, dan Sulawesi. 217-219. Direktorat Permuseuman. Direktorat Jenderal Kebudayaan, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan RI, Jakarta.
- Harborne JB. 1998. *Phytochemical Methods, a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* 3rd Ed. 60-203. Chapman and Hall, London.
- Huang PL, Chi CW, Liu TY. 2010. Effects of *Areca catechu* L. Containing procyanidins on cyclooxygenase-2 expression *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem Toxicol* 48: 306-313. DOI: 10.1016/j.fct.2009.10.014.
- Leite AM, Lima EO, Souza EL, Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA. 2007. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Braz J Pharm Sci* 43: 121-126. DOI: 10.1590/S1516-93322007000100015.
- Mathew GA, Govindarajan VS. 1963. Phenolic substances of arecanut, changes during maturation and ripening. *Phytochem* 3: 657-665. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)82963-5.
- Mayo JA, Ritchie JR. 2009. Acidogenic potential of "sugar-free" cough drops. *Open Dentistry J* 3: 26-30. DOI: 10.2174/1874210600903010026.
- Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. 2006. *Sensory Evaluation Technique* 4th Ed. 276-277. CRC Press, USA (AS).
- Neilands J. 2007. Acid Tolerance of *Streptococcus mutans* Biofilms. 18-21. Malmö University, Holmbergs.
- Ouedrhiri W, Balouiri M, Bouhdid S, Moja S, Chahdi FO, Taleb M, Greche H. 2016. Mixture design of *Origanum compactum*, *Origanum majorana* and *Thymus serpyllum* essential oils: Optimization of their antibacterial effect. *Ind Crops Prod* 89: 1-9. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.04.049.
- Patel M, Gulube Z, Dutton M. 2009. The effect of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* on *Candida albicans* proteinase and phospholipase production and adherence to oral epithelial cells. *J Ethnopharmacol* 124: 562-565. DOI: 10.1016/j.jep.2009.05.002.
- Peng W, Liu YJ, Wu N, Sun T, He XY, Gao YX, Wu CJ. 2015. *Areca catechu* L. (*Arecaceae*): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *J Ethnopharmacol* 164: 340-356. DOI: 10.1016/j.jep.2015.02.010.
- Rahim AZH, Nalina T. 2011. Scanning electron microscopic study of *Piper betle* leaves extract effect against *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *J Appl Oral Sci* 19: 137-146. DOI: 10.1590/S1678-77572011000200010.
- Ramji N, Ramji N, Iyer R, Chandrasekaran S. 2002. Phenolic antibacterials from *Piper betle* in the prevention of halitosis. *J Ethnopharmacol* 83: 149-152. DOI: 10.1016/S0378-8741(02)00194-0.
- Reena A, Michael A. 2009. Study on areca nut for its antimicrobial properties. *J Young Pharm* 1: 42-46. DOI: 10.4103/0975-1483.51874.
- Ren Z, Cui T, Zeng J, Chen L, Zhang W, Xu X. 2015. Molecule targeting glucosyltransferase inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation

- and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 60: 126–35. DOI: 10.1128/AAC.00919-15.
- Santos dos BCB, Silva da JCT, Guerrero PG, Leitao GG, Barata LES. 2009. Isolation of chavibetol from essential oil of *Pimenta pseudocaryphyllus* leaf by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatog A* 1216: 4303-4306. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.01.111.
- Sugumaran M, Suresh GM, Sankarnarayanan K, Yokesh M, Poornima M, Sree RR. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of vellaikodi variety of *Piper betle* Linn leaf oil against dental pathogens. *Int J Pharm Technol Res* 3: 2135-2139.
- Suliantari, Jenie BSL, Suhartono, Apriyantono A. 2008. Aktivitas antibakteri ekstrak sirih hijau (*Piper betle* Linn) terhadap bakteri patogen pangan. *J Teknologi Industri Pangan* 19: 1-7.
- Suwandi T, Suniarti DF, Prayitno SW. 2013. Effect of ethanol extract of *Hibiscus sabdariffa* L. calyx on *Streptococcus sanguinis* viability in vitro biofilm based on crystal violet. *J Med Plants Res* 7: 2476–82. DOI: 10.5897/JMPR12.1195.
- Yunilawati R. 2002. Minyak Atsiri Daun Sirih sebagai Antibakteri *Streptococcus mutans* dalam Pasta Gigi. [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Zhao W, Li W, Lin J, Chen Z, Yu D. 2014. Effect of sucrose concentration on sucrose-dependent adhesion and glucosyltransferase expression of *S. mutans* in children with severe early-childhood caries (S-ECC). *Nutrient* 6: 3572–86. DOI: 10.3390/nu6093572.
- Parianti NKW, Ariyasa IG. 2015. Hubungan kebiasaan menyirih terhadap kejadian karies gigi pada lanjut usia di Desa Batubulan Kangin. *J Virgin* 1: 200-208.