

***THE EFFECT OF BETEL LEAF EXTRACT (Piper betel) TO Candida albicans
GROWTH ON ACRYLIC HEAT-CURE RESIN PLATE***

Hafiz Arif Kurniawan¹, Yusrini Pasril²

Student of Dentistry Study Program¹

Lecturer of Dentistry Study Program²

ABSTRACT

Background: *Poly(methyl methacrylate)* or acrylic resin is the most commonly used material for the manufacture of denture. The presence of acrylic resins in the mouth can promote the growth of various types of fungi and bacteria such as *Candida albicans*. The conventional methods used to control the growth of *Candida albicans* in acrylic resin are immersion in a chemical solution such as *Peroxide*, *Hypochlorite*, or *Chlorhexidine Digikelonate*, but these chemicals can cause discoloration on denture base. *Hydroxychavicol* is the main phenolic component of *Piper betle* leaf. *Hydroxychavicol* showed fungicidal effects on all fungal species including *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* and *Dermatophytes*. **Objective:** This study aims to prove the effect of immersion of acrylic resin plate in betel leaf extract on *Candida albicans* growth. **Methodology:** The design used in this study was laboratory in vitro experimental. 30 acrylic resin plates are made using *heat-cure* acrylic resin. Acrylic resin plate is divided into 3 groups : (1) Acrylic resin plate is immersed in a solution of betel leaf extract with 10% concentration, (2) Acrylic resin plate immersed in Sodium Hypochlorite solution with 10% concentration as positive control, and (3) The acrylic resin plate is immersed in sterile distilled water as a negative control. Measurements were made by *Crystal Violet Assay* method using Crystal Violet dye and Spektrophotometer Vis. **Results:** The betel leaf extract solution was effective in inhibiting the growth of *Candida albicans* when compared with immersion using aquadest, but the betel leaf solution was less effective in inhibiting the growth of *Candida albicans* when compared to the immersion using Sodium Hypochlorite. **Conclusion:** The betel leaf extract solution is effective in inhibiting the growth of *Candida albicans* but the betel leaf extract solution can not be an alternative solution to replace the Sodium Hypochlorite solution in the case of inhibiting the growth of *Candida albicans* on *heat-cure* acrylic resin plate.

Keywords: *Candida albicans*, *Hydroxychavicol*, *Piper betle L.*, NaOCL, heat-cure acrylic resin, *Crystal Violet Assay*

PENGARUH EKSTRAK DAUN SIRIH HIJAU (*Piper betel*) TERHADAP PERTUMBUHAN *Candida albicans* PADA PLAT RESIN AKRILIK HEAT-CURE

Hafiz Arif Kurniawan¹, Yusrini Pasril²

Mahasiswa Kedokteran Gigi UMY¹

Dosen Kedokteran Gigi UMY²

INTISARI

Latar Belakang: *Poly(methyl methacrylate)* atau resin akrilik adalah suatu bahan yang paling umum digunakan untuk pembuatan gigi tiruan. Adanya resin akrilik di dalam mulut dapat meningkatkan pertumbuhan berbagai jenis jamur dan bakteri seperti *Candida albicans*. Metode konvensional yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan *Candida albicans* pada resin akrilik adalah perendaman dalam larutan kimia seperti Peroksida, Hipoklorit, atau Chlorhexidine Diglukonat, tetapi zat kimia ini dapat menyebabkan perubahan warna pada resin akrilik. *Hydroxychavicol* adalah komponen fenolik utama dari ekstrak daun *Piper betle*. *Hydroxychavicol* menunjukkan efek fungisida terhadap semua spesies jamur termasuk *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* dan *Dermatofit*. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh perendaman plat resin akrilik dalam ekstrak daun sirih hijau terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. **Metodologi:** Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara in vitro. 30 plat resin akrilik dibuat dengan menggunakan resin akrilik *heat-cure*. Plat resin akrilik dibagi menjadi 3 kelompok : (1) Plat resin akrilik direndam dalam larutan ekstrak daun sirih dengan konsentrasi 10%, (2) Plat resin akrilik direndam dalam larutan Sodium Hipoklorit dengan konsentrasi 10% sebagai kontrol positif, dan (3) Plat resin akrilik direndam dalam akuades steril sebagai kontrol negatif. Pengukuran dilakukan dengan metode *Crystal Violet Assay* menggunakan pewarna Kristal Violet dan Spektrophotometer Vis. **Hasil:** Larutan ekstrak daun sirih hijau efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* jika dibandingkan dengan perendaman menggunakan akuades, namun Larutan daun sirih kurang efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* jika dibandingkan dengan perendaman menggunakan Sodium Hipoklorit. **Kesimpulan:** Larutan ekstrak daun sirih efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* namun larutan ekstrak daun sirih tidak dapat menjadi larutan alternatif untuk menggantikan larutan Sodium Hipoklorit dalam hal menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada plat resin akrilik *heat-cure*.

Kata Kunci: *Candida albicans*, *Hydroxychavicol*, *Piper betle L.*, NaOCL, resin akrilik *heat-cure*, *Crystal Violet Assa*

Pendahuluan

Poly(methyl methacrylate) (PMMA) atau resin akrilik adalah suatu bahan yang paling umum digunakan untuk pembuatan gigi tiruan.¹ Resin akrilik *heat-cure* telah menjadi bahan dari basis gigi tiruan yang paling umum digunakan selama lebih dari 60 tahun.² Telah diketahui sejak awal tahun 1970-an dari pengamatan in vitro dan in vivo bahwa PMMA dapat meningkatkan pertumbuhan berbagai jenis jamur dan bakteri seperti *Candida albicans* dan spesies *Candida* lainnya, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*.³

Candida albicans adalah jamur dimorphic gram positif yang mampu hidup di rongga mulut orang sehat.⁴ Lokasi utama dari *Candida albicans* adalah posterior lidah dan jaringan mukosa, sedangkan lokasi sekundernya adalah lapisan yang menutupi permukaan gigi.⁵ Salah satu hal penting dari *Candida albicans* adalah kemampuannya untuk membentuk biofilm pada permukaan padat seperti enamel gigi dan permukaan resin akrilik pada gigi tiruan.

Metode konvensional yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan *Candida albicans* pada resin akrilik adalah perendaman dalam larutan kimia seperti Peroksida, Hipoklorit, atau Chlorhexidine Diglukonat, tetapi zat kimia ini dapat menyebabkan perubahan warna pada basis GT. Oleh karena itu, larutan alternatif untuk merendam GT sangat diharapkan.

Piper betle (*Piperaceae*) telah banyak digunakan sebagai obat herbal tradisional di India, Cina, Taiwan, Thailand dan banyak negara lain.⁶ *Hydroxychavicol* adalah komponen fenolik utama dari ekstrak daun *P. betle* L..⁷ *Hydroxychavicol* menunjukkan efek

fungisida terhadap semua spesies jamur termasuk *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* dan Dermatofit.⁶

Dalam penelitian ini, kami akan menguji apakah ekstrak dari daun sirih hijau (*Piper betle*) memiliki pengaruh pada perendaman plat resin akrilik terhadap tingkat pertumbuhan *Candida albicans* dibandingkan dengan larutan kimia.

Bahan dan Metode

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara in vitro, yaitu mengetahui adanya daya anti-jamur pada ekstrak daun sirih (*Piper betle*) terhadap *Candida albicans*. Sample dalam penelitian ini adalah plat resin akrilik berukuran 10x10x1 mm yang telah diinkubasi dengan *Candida albicans*.

Pembuatan ekstrak daun sirih yang digunakan dengan cara daun sirih segar dicuci bersih kemudian ditiriskan, lalu daun sirih diiris kecil-kecil dan ditimbang seberat 250 mg. Daun sirih kemudian dikeringkan dengan cara menjemur daun sirih di dalam ruang yang tidak terpapar matahari secara langsung. Apabila daun sudah kering, daun kemudian dihaluskan/diblender hingga menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh ditimbang seberat 100 gram kemudian dimaserasi dengan etanol 96 % sebanyak 1,5 liter sampai seluruh bagian terendam. Ekstrak kemudian disaring dengan corong Buchner dan hasil saringan yang didapat adalah ekstrak cair. Ekstrak cair tersebut kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol dengan menggunakan vakum evaporator (Rotary evaporator) pada suhu 40° C selama 3 jam hingga ekstrak menjadi kental. Kemudian ekstrak disterilkan dalam autoklav pada suhu 121°

C selama 15 menit dan diperoleh 25 ml ekstrak dan hasil tersebut menunjukkan 100% ekstrak daun sirih dalam air. Dilakukan pengenceran dengan menggunakan pelarut akuades steril hingga mendapat konsentrasi sebesar 10%.

Plat resin akrilik (10 x 10 x 1) mm direndam di dalam aquadest steril selama 48 jam untuk mengurangi sisa monomer. Sterilisasi plat resin akrilik menggunakan oven pada suhu 170° C selama 30 menit. Kemudian plat resin akrilik direndam dalam saliva steril selama 1 jam. Setelah direndam, plat resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi *Candida albicans*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C.

10 plat resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang masing – masing berisi 5 ml ekstrak daun sirih dengan konsentrasi 10%. Pada kelompok kontrol (+), 10 plat resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml larutan Sodium Hipoklorit dengan konsentrasi 10%, dan pada kelompok kontrol (-), 10 plat resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml akuades steril. Lama perendaman yang dipergunakan adalah 3 menit.

Plat resin akrilik, yang telah diberikan perlakuan, dibilas dengan 1 ml akuades untuk menghilangkan *Candida albicans* yang sudah mati atau yang tidak lagi menempel pada plat resin akrilik. *Candida albicans* pada plat resin akrilik diwarnai dengan 1 ml larutan Kristal Violet dengan konsentrasi 1% dan didiamkan selama 5 menit. Larutan Kristal Violet yang tidak diserap dibilas dari plat resin akrilik dengan cara direndam di akuades kemudian dikeringkan. Kristal Violet yang diikat oleh *Candida albicans*

yang masih hidup dan menempel di plat resin akrilik dilepaskan dari *Candida albicans* dengan 5 ml larutan Asam Asetat konsentrasi 33%. Larutan hasil pelepasan Kristal Violet dari *Candida albicans* diukur menggunakan Spektrofotometer Vis dan diatur pada panjang gelombang 570 nm.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian yang dilakukan untuk menguji pengaruh ekstrak daun sirih terhadap pertumbuhan *Candida albicans* pada plat resin akrilik. Pengujian ini dilakukan secara *In Vitro* dengan menggunakan teknik pengukuran *Cristal Violet Assay* untuk mengukur tingkat absorbansi pada tiap plat yang telah diberikan perlakuan. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer.

Pada tabel 1 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan daya hambat pada tiap perlakuan dengan melihat rata-rata dari nilai absorbansi pada kelompok daun sirih, sodium hipoklorit, dan akuades. Semakin kecil nilai absorbansi menandakan bahwa semakin kecil pula jumlah *Candida albicans* yang masih hidup dan semakin tinggi daya hambat dari larutan tersebut. Nilai minimal dari tiap kelompok uji adalah 0.451 Abs/cm² untuk kelompok daun sirih, 0.419 Abs/cm² untuk kelompok sodium hipoklorit, dan 0.553 Abs/cm² untuk kelompok akuades. Nilai maksimal dari tiap kelompok uji adalah 0.601 Abs/cm² untuk kelompok daun sirih, 0.558 Abs/cm² untuk kelompok sodium hipoklorit, dan 0.747 Abs/cm² untuk kelompok akuades. Nilai rata-rata dari tiap kelompok uji adalah 0.548 Abs/cm² untuk kelompok daun sirih, 0.491 Abs/cm² untuk kelompok sodium hipoklorit, dan 0.648

TABEL 1. Hasil pengukuran tingkat absorbansi (Abs/cm²)

No	Daun Sirih	Sodium Hipoklorit	Akuades
1	0,546	0,546	0,553
2	0,536	0,468	0,641
3	0,601	0,519	0,611
4	0,485	0,423	0,747
5	0,568	0,558	0,682
6	0,601	0,552	0,703
7	0,563	0,502	0,696
8	0,451	0,479	0,555
9	0,574	0,419	0,670
10	0,551	0,442	0,621
\bar{x}	0,548	0,491	0,648

Abs/cm² untuk kelompok akuades. Larutan sodium hipoklorit memiliki daya hambat lebih tinggi dibandingkan oleh larutan uji ekstrak daun sirih, dan larutan ekstrak daun uji daun sirih memiliki daya hambat lebih tinggi dibandingkan akuades.

Hasil yang didapatkan setelah uji LSD adalah sebagai berikut:

1. Terdapat perbedaan yang bermakna (Sig. < 0,05) antara ekstrak daun sirih dengan sodium hipoklorit dan akuades.
2. Terdapat perbedaan yang bermakna (Sig. < 0,05) antara sodium hipoklorit dengan ekstrak daun sirih dan akuades.
3. Terdapat perbedaan yang bermakna (Sig. < 0,05) antara akuades dengan ekstrak daun sirih dan sodium hipoklorit.

Dari data diatas dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada setiap kelompok.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun sirih

hijau dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada plat resin akrilik. Pada penelitian ini menggunakan metode *Crystal Violet Assay*, yang dilakukan dengan cara memberikan pewarnaan kristal violet pada *Candida albicans* yang masih hidup dan menempel pada plat resin akrilik, kemudian larutan pewarna tersebut dilepas dari *Candida albicans* dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.

Pembentukan biofilm *Candida albicans* pada resin akrilik adalah sebuah proses kompleks yang memerlukan koordinasi dari beberapa respons sinyal.⁸ Biofilm *Candida albicans* dapat mengakibatkan suatu masalah di mulut seperti kandidiasis pada kondisi klinis dimana *Candida albicans* dapat terbentuk di permukaan rongga mulut dan plat resin akrilik.⁹ Proses terbentuknya biofilm *Candida albicans* telah digambarkan sebagai proses yang dimulai dengan penempelan *Candida albicans* pada permukaan substrat (jaringan rongga mulut atau gigi tiruan), diikuti oleh proliferasi sel ragi dari *Candida albicans*

di permukaan substrat dan tahap awal dari pengembangan hyphal.⁹ Langkah akhir dari pengembangan biofilm *Candida albicans* adalah tahap pematangan: pertumbuhan sel ragi berhenti, pertumbuhan hifa meningkat, dan matriks ekstraselular mulai menyelimuti biofilm.⁸

Adanya perbedaan yang bermakna antara perendaman resin akrilik *heat-cure* menggunakan akuades dan perendaman menggunakan ekstrak daun sirih hijau terdapat pada kandungan yang dimiliki masing masing larutan. Pada kelompok perendaman menggunakan ekstrak daun sirih hijau, salah satu kandungan yang dimiliki oleh daun sirih hijau adalah *Hydroxychavicol*. *Hydroxychavicol* yang terdapat dalam ekstrak daun *Piper betle* (*Piperaceae*) diketahui memiliki efek anti-fungi yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.⁶ Peningkatan penyerapan propidium iodida dalam sel-sel *Candida albicans* yang diuji dengan *Hydroxychavicol*, menegaskan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa *Hydroxychavicol* dapat mengubah struktur dari membran sel, yang mengakibatkan terganggunya permeabilitas dari struktur membran mikroba.¹⁰ Propidium iodide adalah larutan pewarna asam nukleat yang tidak dapat menembus struktur membran dari sel-sel mikroba yang masih sehat. Namun, sel-sel mikroba dengan selaput sel yang rusak atau permeabilisasi yang terganggu dapat mengakibatkan propidium iodida menembus sel-sel mikroba tersebut. Oleh karena itu, mikroba yang terwarnai oleh pewarnaan propidium iodida menunjukkan adanya kerusakan pada membran sitoplasma (bakteri) dan membran plasma (ragi).¹¹

Pada perendaman menggunakan Sodium Hipoklorit, perbedaan yang

bermakna apabila dibandingkan dengan akuades disebabkan karena efek antimikroba yang dimiliki dari Sodium Hipoklorit. Sodium Hipoklorit dapat mempengaruhi kemampuan *Candida* untuk bertahan hidup di dalam flora mulut. Secara umum, Sodium Hipoklorit menurunkan kemampuan *Candida* untuk adhesi ke permukaan basis resin akrilik serta menurunkan kemampuan untuk melekat pada sel epitel bukal, menurunkan produksi protein pada dinding sel *Candida* dan menurunkan tingkat pembentukan hifa dalam serum.⁵

Hasil dari perendaman menggunakan ekstrak daun sirih hijau dan sodium hipoklorit dibandingkan untuk mengetahui apakah ekstrak daun sirih memiliki efek anti-jamur yang sama, lebih tinggi, atau lebih rendah dari sodium hipoklorit. Hasil yang didapatkan adalah efek anti jamur dari daun sirih hijau lebih rendah daripada sodium hipoklorit, hal ini diakibatkan kemampuan anti-jamur dari ekstrak daun sirih hijau untuk menghambat pertumbuhan *Candida albicans* hanya terdapat pada kemampuan untuk mengganggu permeabilitas dari struktur membran mikroba. Sedangkan pada larutan sodium hipoklorit, selain memiliki kemampuan untuk menghancurkan struktur membran mikroba, sodium hipoklorit juga menurunkan kemampuan *Candida* untuk adhesi ke permukaan basis resin akrilik serta menurunkan kemampuan untuk melekat pada sel epitel bukal, menurunkan produksi protein pada dinding sel *Candida* dan menurunkan tingkat pembentukan hifa dalam serum.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh maka dapat disimpulkan

bahwa larutan ekstrak daun sirih efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada plat resin akrilik *heat-cure* dengan konsentrasi 10% dan direndam selama 3 menit jika dibandingkan dengan perendaman menggunakan akuades. Namun, larutan ekstrak daun sirih konsentrasi 10% tidak dapat menjadi larutan alternatif untuk menggantikan larutan Sodium Hipoklorit konsentrasi 10% dalam hal menghambat pertumbuhan *Candida albicans* pada plat resin akrilik *heat-cure*.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variable yang berbeda seperti suhu larutan, ukuran dan bentuk plat, jenis daun sirih yang digunakan, dan lain-lain.
2. Untuk mengembangkan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) menjadi produk untuk merendam gigi tiruan perlu dilakukan uji farmakologi dan uji toksikologi.

Daftar Pustaka

1. De Clerck, J. P. (1987). Microwave polymerization of acrylic resins used in dental prostheses. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 57(5), hh. 650–658.
2. Heidari, B., Firouz, F., Izadi, A., Ahmadvand, S. dan Radan, P. (2015). Flexural Strength of Cold and Heat Cure Acrylic Resins Reinforced with Different Materials. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*, 12(5), hh. 316–323.
3. Gautam, R., Singh, R. D., Sharma, V. P., Siddhartha, R., Chand, P. dan Kumar, R. (2012). Biocompatibility of polymethylmethacrylate resins used in dentistry. *Journal of Biomedical*

Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 100B(5), hh. 1444–1450.

4. Salerno, C., Pascale, M., Contaldo, M., Esposito, V., Busciolano, M., Milillo, L., Guida, A., Petruzzi, M. dan Serpico, R. (2011). *Candida-associated denture stomatitis. Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 16(2), hh. e139–e143.
5. Webb, B. C., Willcox, M. D. P., Thomas, C. J., Harty, D. W. S. dan Knox, K. W. (1995). The effect of sodium hypochlorite on potential pathogenic traits of *Candida albicans* and other *Candida* species. *Oral Microbiology and Immunology*, 10(6), hh. 334–341.
6. Ali, I., Khan, F. G., Suri, K. A., Gupta, B. D., Satti, N. K., Dutt, P., Afrin, F., Qazi, G. N. dan Khan, I. A. (2010). In vitro antifungal activity of hydroxychavicol isolated from *Piper betle* L. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 9(1), h. 7.
7. Chang, M. C., Uang, B. J., Wu, H. L., Lee, J. J., Hahn, L. J. dan Jeng, J. H. (2002). Inducing the cell cycle arrest and apoptosis of oral KB carcinoma cells by hydroxychavicol: roles of glutathione and reactive oxygen species. *British journal of pharmacology*, 135(3), hh. 619–630.
8. Blankenship, J. R. dan Mitchell, A. P., (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), hh. 588–594.
9. Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, hh. 30–36.
10. Nalina, T dan Rahim, Z. H. A. (2007). The Crude Aqueous Extract of *Piper betle* L. and its Antibacterial Effect Towards *Streptococcus mutans*.

American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 3(1), hh. 10–15.

11. Cox, S., Mann, C., Markham, J., Gustafson, J., Warmington, J. dan Wyllie, S. (2001). Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. *Molecules*, 6(12), hh. 87–9.