

ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF BOILED CASHEW BARK (*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*) ON *C. ALBICANS* IN ACRYLIC RESIN

DAYA ANTIFUNGI REBUSAN KULIT BATANG JAMBU METE (*ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*) TERHADAP *C. ALBICANS* PADA RESIN AKRILIK

Ria Lidyawita^{1*}, Sudarsono¹, Harsini²

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

Faculty of Medicine Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

ABSTRACT

Lack of dental care will be resulted in the increased colonies of *C. albicans* if the dental care was not in ordinary condition that can cause denture stomatitis. *C. albicans* is common in denture wearer and is found as many as 86% of patients with denture stomatitis. Cashew bark contains tannins, gallic acid and anacardic acid, phenolic compounds which are responsible for the antifungal activity against *C. albicans*. This research consisted of determination of total phenolic compound by Folin Ciocalteu method, and the antifungal test against *C. albicans* in acrylic resin plate. Acrylic resin plate was immersed in a suspension of *C. albicans* for 24 hours, rinsed with Phosphate Buffered Saline (PBS), soaked with agitation for 3 minutes in a solution of cashew stem bark 12.5%w/v, 25%w/v, and 50% w/v with 20 mg/ml stock, vibrated in physiological saline, incubated on Sabouraud order for 48 hours. At the end of the experiment, the inhibition of *C. albicans* growth was observed and calculated. Anava and Kruskal-Wallis test were used to determine the significance difference between groups. Water extract of stem bark in the concentration of 12,5%w/v, 25%w/v, and 50% w/v had phenolic total value of 35,18% w/w EAG, 31,64%w/w EAG, 29,47%w/w EAG. It could inhibit *C. albicans* by 69.69%, 82.66%, 94.14% respectively.

Key words: *Anacardium occidentale L.*, Antifungal, *C. albicans*, Denture stomatitis.

ABSTRAK

Kurangnya perawatan gigi palsu berakibat pada tingkat kepadatan koloni *Candida albicans* yang dapat menyebabkan denture stomatitis. Mikroba tersebut sering dijumpai pada pemakai gigi tiruan dan dijumpai sebanyak 86% dari penderita denture stomatitis. Pada kulit batang jambu mete terdapat tanin, asam galat dan asam anakardat, yaitu komponen fenolik dengan aktivitas antijamur terhadap *C. albicans*. Penelitian ini meliputi pengumpulan bahan, perebusan, freeze drying, identifikasi fitokimia asam anakardat dan asam galat, penetapan kandungan fenolik total dengan metode Folin Ciocalteu, dan uji daya antifungi terhadap *C. albicans* pada plat resin akrilik. Plat resin akrilik direndam dalam suspensi *C. albicans* selama 24 jam, dibilas dengan Phosphate Buffer saline (PBS), direndam disertai agitasi selama 3 menit dalam larutan hasil freeze drying rebusan kulit batang jambu mete konsentrasi 12,5%b/v, 25%b/v, dan 50%b/v dengan stok 20mg/mL, divibrasi dalam NaCl fisiologis yang kemudian diinkubasi pada Agar Sabouraud selama 48 jam, diamati dan dihitung persentase penghambatan pertumbuhan *C. albicans*. Analisis statistik dengan Anava, dilanjutkan uji Kruskal-Wallis untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rebusan kulit batang jambu mete konsentrasi 12,5%b/v, 25%b/v, dan 50%b/v memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan *C. albicans* yang berbeda bermakna, yaitu berturut – turut 69,69%, 82,66%, 94,14% dan kandungan fenolik total yang berbeda bermakna, yaitu berturut – turut 35,18%b/b EAG, 31,64%b/b EAG, 29,47%b/b EAG.

Kata kunci: *Anacardium occidentale L.*, Antifungi, *C. albicans*, Denture stomatitis.

PENDAHULUAN

Gigi goyah dan kemudian tanggal dapat disebabkan karena perawatan gigi yang tidak benar dan tidak kontinyu. Hal ini dapat disebabkan karena bertambahnya umur atau faktor keturunan.

Pemakaian gigi tiruan merupakan alternatif agar kepercayaan diri tetap ada. Perawatan gigi tiruan perlu dilakukan dengan tujuan pengurangan kemungkinan terjadi perlekatan mikroba, sehingga bau mulut, timbulnya plak dan denture stomatitis

dapat dikurangi. Permukaan yang lebih kasar pada gigi tiruan lebih mudah ditempeli plak (Lundin dan Emilson, 1989) sehingga berdampak pada tingkat kepadatan koloni *C. albicans* (Samaranayake *dkk.*, 1995) dan *denture stomatitis* (Soenartyo dan Hadi, 2000). Salah satu bahan alam yang digunakan secara turun temurun oleh masyarakat tradisional adalah jambu mete (*Anacardium occidentale* Linn.). Penggunaan secara tradisional yaitu berkumur dengan air rebusan kulit batang jambu mete dan daun muda (Dalimartha, 2000) dapat untuk pencegahan sariawan, radang pada mulut, dan sakit gigi (Anonim, 1985). Kulit batang jambu mete aktivitas antifungi karena keberadaan senyawa tanin, asam galat dan asam anakardat (Kannan *dkk.* 2009; Kozubek *dkk.*, 2001). Komponen fenolik terkait dengan aktivitas anti *C. albicans* (Ezoubeiri *dkk.*, 2005). Asam anakardat berefek fungisidal secara *in vitro* (Prithiviraj *dkk.*, 1997). Diharapkan hasil penelitian ini diperoleh data efek antifungi rebusan kulit batang jambu mete terhadap *C. albicans*.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Kulit batang jambu mete diambil dari halaman Fakultas Kedokteran Gigi UGM secara acak, air suling, fase gerak KLT npropanol : asam asetat : air suling (3:1:1v/v/v). Fase gerak RP-HPLC metanol : asam asetat 4% (90:10v/v). Pereaksi Folin Ciocalteu, Agar Sabouraud, larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS), kloramfenikol, dan suspensi *C.albicans*.

Alat Liquid - *Liquid Continuous Extraction* (LLCE), *freeze dryer*, kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu LC-10AD, kolom: LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)) dilengkapi detektor UV-vis, plat silika gel 60 F254, vibrator.

Jalannya Penelitian

Pembuatan Sampel

Kulit batang jambu mete dibersihkan dari kulit luar, lumut, dan jamur, dicuci dengan air suling hingga bersih, dipotong 1 x 1 cm, dan ditimbang berdasarkan konsentrasi rebusan yaitu 12,5%b/v; 25%b/v; dan 50%b/v. Air suling 100mL direbus hingga mendidih kemudian kulit batang jambu mete dimasukkan sesuai konsentrasinya, dan direbus selama 15 menit.

Hasil rebusan untuk bahan uji dikeringkan dengan *freeze dryer*. Identifikasi kandungan senyawa aktif yaitu masing-masing

konsentrasi rebusan diambil 35mL kemudian dipartisi dengan pelarut organik (etilasetat) sebanyak 70mL menggunakan alat LLCE. Proses partisi dilakukan selama 5-6 jam.

Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Fase etil asetat digunakan untuk analisis kualitatif dengan KLT dan KCKT. Identifikasi secara KLT digunakan fase diam Silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak n-propanol-asam asetat-air (3:1:1v/v/v). Pereaksi semprot yang digunakan yaitu besi (III) klorida (FeCl₃), vanilin-asam sulfat, 2,4- dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH), bromkresol hijau, dan uap iodium. Bercak diamati pada sinar tampak, lampu UV254nm, UV366nm dan perubahannya setelah penyemprotan dan dihitung nilai hRf-nya.

Fase diam KCKT yaitu C₁₈, fase gerak metanol:asam asetat 4% (90:10v/v), dan kecepatan alir 1mL/menit dengan detektor UV panjang gelombang 279nm (Kresnamurti dan Budiati, 2008). Dari hasil KCKT didapatkan data waktu retensi (Rt) dan persentase kadar relatif dari luas area yang digambarkan.

Penetapan kandungan fenolik total

Larutan induk asam galat dan serbuk kering hasil *freeze drying* (sampel) dibuat dengan konsentrasi 1mg/mL. Pereaksi Folin Ciocalteu sebanyak 0,4 mL dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, ditambah larutan induk (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90)µL, dan diamkan selama 5-8 menit, kemudian ditambah dengan 4,0mL Na₂CO₃ 7%b/v dan air suling hingga tanda. Reaksi ditunggu selama 90 menit (*operating time*) agar sempurna dan dibaca pada panjang gelombang maksimal. Sampel diperlakukan sama seperti larutan induk asam galat, dilakukan replikasi sebanyak 2 kali. Blanko dibuat seperti cara diatas tanpa sampel.

Uji Antifungi

Di ketiga konsentrasi (12,5;25;50)%b/v digunakan larutan induk 20mg/mL. Plat resin akrilik dengan diameter 1,5cm, tebal 0,3 cm dicuci di bawah air mengalir kemudian disterilisasi dengan autoklaf, direndam dalam suspensi *C. albicans* 10⁶CFU/mL, diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan, dibilas dalam 5mL PBS, lalu diberi perlakuan yaitu: kontrol negatif (K(-)), plat resin akrilik direndam dalam air suling; kontrol positif, direndam dalam klorheksidin glukonat 0,2%; perlakuan I (S1), direndam dalam larutan *freeze drying* kulit batang jambu mete konsentrasi 12,5%; perlakuan II (S2), direndam dalam larutan

*Correspondence: Ria Lidyawita
E-mail : imsukadana@yahoo.com

freeze drying kulit batang jambu mete konsentrasi 25% dan perlakuan III (S3), direndam dalam larutan *freeze drying* kulit batang jambu mete konsentrasi 50%.

Perendaman plat resin akrilik selama 3 menit dengan agitasi, dibilas dengan PBS, kemudian dimasukkan dalam NaCl fisiologis 10 ml dan dihomogenkan selama 30 detik. Larutan NaCl fisiologis sebanyak 0,1mL hasil vibrasi diambil, diratakan dengan *spreader* di atas Agar Saboraud (dengan kloramfenikol) pada piring petri, dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar. Replikasi sebanyak 2 kali. Penentuan daya antifungi dengan metode resin akrilik berdasarkan kemampuan rebusan kulit batang jambu mete dalam penghambatan pertumbuhan *C. albicans*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan sampel

Hasil rebusan yang diperoleh yaitu 50mL, 40mL, dan 30mL, untuk masing-masing konsentrasi 12,5%b/v; 25%b/v; 50%b/v. Rebusan yang diperoleh berwarna coklat, tidak berbau, dan berasa sepet atau kelat. Hal tersebut karena terdapat senyawa polifenolik. Hasil pengeringan dengan *freeze dryer* didapatkan rendemen 2,219%b/b; 4,388%b/b; dan 5,702%b/b untuk masing-masing konsentrasi 12,5 %b/v; 25%b/v; 50%b/v. Etil asetat hasil fraksinasi untuk sampel KCKT diuapkan, residu ditimbang, dan didapat rendemen 0,2%b/v; 0,2%b/v; dan 1%b/v untuk masing-masing konsentrasi 12,5%b/v; 25 %b/v; 50%b/v.

Analisis kualitatif metabolit

Hasil dari identifikasi secara KLT didapat $hRf \pm SD$ yaitu $84 \pm 2,51$; $84 \pm 2,55$; $86 \pm 3,74$ untuk masing-masing konsentrasi 12,5%b/v; 25%b/v; 50%b/v. Pereaksi semprot yang digunakan sesuai gugus fungsi dari senyawa target. Hasil dari penyemprotan didapatkan hasil yang positif untuk semua pereaksi semprot yaitu ikatan rangkap atau jenuh pada rantai karbon dideteksi dengan uap iodium, senyawa fenol dengan $FeCl_3$, senyawa organik yang memiliki ikatan rangkap dengan vanilin asam sulfat, asam karboksilat dengan bromkresol hijau, gugus karbonil dengan pereaksi semprot 2,4-DNPH. Bercak yang terelusi berwarna coklat karena senyawa aktif yang ingin diteliti merupakan senyawa fenolik yang mudah terpolimerisasi. Pada UV254nm bercak meredam karena ada ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat menyerap gelombang 254nm pada lempeng yang berfluoresensi. Sedangkan pada UV366nm berfluoresensi biru karena interaksi antara sinar

UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom pada senyawa.

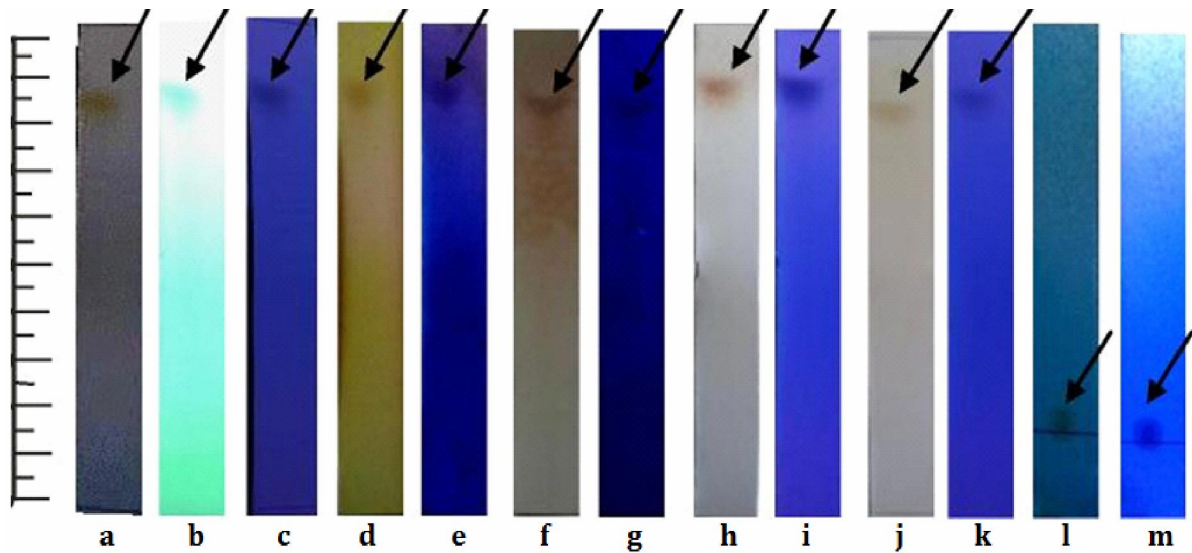
Pada analisis dengan KCKT terlihat adanya kemiripan waktu retensi antara standar asam anakardat dengan rebusan kulit batang jambu mete konsentrasi 12,5%b/v, 50%b/v. Pengamatan hasil kromatogram didapatkan data bahwa senyawa standar asam anakardat memiliki kadar relatif 12,315% dan kromatogram sampel mempunyai waktu retensi sama dengan standar rebusan dengan konsentrasi 50%b/v serta memiliki kadar relatif 0,210%. Pada sampel rebusan konsentrasi 12,5%b/v kadar relatifnya sebesar 0,006%. Dilakukan juga spiking dengan menggunakan sampel rebusan konsentrasi 50%b/v untuk memperjelas keberadaan asam anakardat. Hasil spiking antara sampel dengan senyawa standar diperoleh informasi bahwa puncak sampel uji pada menit ke-11 adalah asam anakardat karena terjadi penambahan luas area pada spiking. Penambahan luas area meningkatkan persentase kadar relatif 0,210% menjadi 0,357%. Hasil kromatogram dapat dilihat pada tabel I di bawah ini.

Penetapan kandungan fenolik total

Penelitian dilanjutkan dengan Folin Ciocalteu. Metode ini cepat, sensitif, dan sederhana. Penentuan kandungan fenolik total dengan metode spektrofotometri dan pereaksi Folin Ciocalteu ini absorbansinya diukur pada abs 750nm dan operating time 90 menit (Chun dkk., 2003). Kurva baku yang digunakan sebagai pembanding adalah asam galat. Kadar senyawa fenolik ditunjukkan dalam % EAG (Ekivalen asam galat) karena belum diketahui struktur kimia senyawa fenolik yang terdapat dalam kulit batang jambu mete. Asam galat digunakan karena stabil, berupa senyawa murni, dan relatif mahal.

Setelah itu hasil absorbansi dari sampel 12,5%b/v, 25%b/v, dan 50%b/v dengan konsentrasi 1 mg/mL dan replikasi sebanyak 2 kali dimasukkan ke kurva baku. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel II.

Secara teoritis peningkatan konsentrasi rebusan setara dengan peningkatan kadar fenolik karena diasumsikan fenolik yang terkandung juga semakin banyak, tetapi pada penelitian ini terjadi penurunan kadar fenolik. Hal ini disebabkan karena semakin banyak fenolik dalam konsentrasi rebusan berarti semakin banyak terjadi polimerisasi, sehingga gugus hidroksi fenolik bebas menjadi berkurang. Dari analisis menggunakan anava satu jalur terdapat perbedaan bermakna data antar kelompok.



Gambar 1. Fraksi etilasetat rebusan 12,5%b/v (a) sinar tampak; (b) UV254nm ; (c) UV 366nm ; (d) 2,4 DNPH; (e) 2,4-DNPH_UV366nm; (f) FeCl₃ ; (g) FeCl₃_UV366nm; (h) vanilin as-sulfat; (i) vanilin as- sulfat_UV366nm (j) uap iod; (k)uap iod_UV366nm (l) bromkresol hijau (m) bromkresol hijau_UV366nm.

Tabel I. Hasil kromatogram

Sampel Peak	pelarut DMSO	standar asam anakardat	Sampel LLCE rebusan 12,5% b/v	Sampel LLCerebusan 25%b/v	Sampel LLCE rebusan 50%b/v	Spiking (LLCE rebusan 50%+standar
1	0,996	1,382	1,05	1,05	1,166	1,1
2	1,448	11,374	4,442	9,671	6,008	5,967
3			11,236	14,302	8,342	8,262
4			20,631	17,050	11,482	11,545
1	2,817	14.297.994	109.261.721	116.563.859	51.632.699	49.883.735
2	638.854	1.918.344	82.103	4.547	9.381	8.993
3			6.836	3.506	2.351	2.102
4			1.570	1.138	107.471	176.428
1	0,4390	88,1703	99,9073	99,9892	99,7697	99,6255
2	99,561	11,8297	0,0751	0,0039	0,0181	0,0180
3			0,0063	0,0030	0,0045	0,0042
4			0,0014	0,0010	0,2077	0,3524

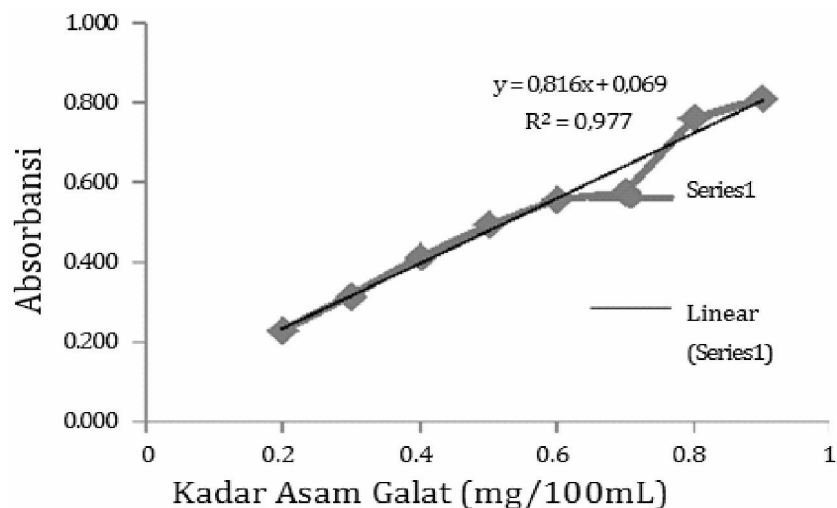
Keterangan:LLCE = *liquid-liquid continuous extraction* Aparatus; DMSO=dimetilsulfoksida

Uji antifungi

Data menunjukkan bahwa konsentrasi sampel yang semakin tinggi maka daya antifungi semakin baik karena koloni *C. albicans* yang tumbuh semakin sedikit. Data koloni *C. albicans* (CFU/mL) dibuat dalam persentase penghambatan pertumbuhan *C. albicans* (Tabel II). Semakin tinggi konsentrasi rebusan kulit batang jambu mete maka semakin tinggi daya penghambatan terhadap pertumbuhan *C.*

albicans seperti yang terlihat pada grafik di bawah ini.

Pengamatan pada Gambar 3 dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi persentase penghambatan. Hubungan antara setiap konsentrasi dengan kontrol positif dapat diketahui dengan statistik menggunakan SPSS 16.0. Dari hasil analisis data berbeda bermakna antara kelompok kontrol positif, ekstrak 12,5%b/v, 25%b/v, dan 50%b/v.



Gambar 2. Kurva baku antara kadar asam galat (mg/100mL) dengan absorbansi

Tabel II. Kadar fenolik total rebusan kulit batang jambu mete

Sampel	Kadar (%b/bEAG)			X̄	SD
	1	2	3		
12,5%	34,56	35,21	35,78	35,18	0,61
25%	28,76	31,94	34,23	31,64	2,75
50%	28,19	28,89	31,34	29,47	1,65

Tabel III. Persentase penghambatan pertumbuhan *C.albicans*

Ket.	%penghambatan pertumbuhan <i>C. albicans</i>			X̄	SD
	1	2	3		
Sampel 12,5%	60,08	74,82	74,18	69,69	8,33
Sampel 25%	80,61	83,05	84,31	82,66	1,88
Sampel 50%	94,87	95,39	92,16	94,14	1,74
Kloram- fenikol	93,54	96,37	100	96,63	3,24

Tabel IV. Perbandingan kandungan fenol total dan % penghambatan

Kons.	Kandungan Fenol total (%b/bEAG)	%penghambatan pertumbuhan <i>C.albicans</i>
12,5%	35,19	69,69
25%	31,64	82,66
50%	29,47	94,14

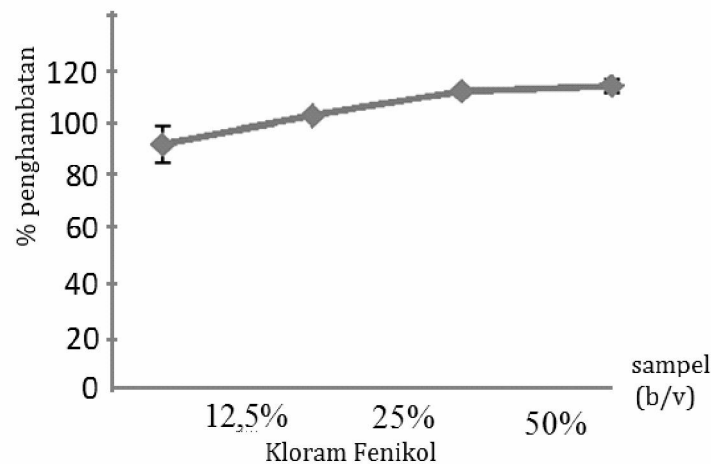
Hubungan fenolik dengan antifungi

Komponen fenolik bertanggung jawab pada aktivitas antijamur melawan *C. albicans* (Ezoubeiri dkk, 2005). Mekanisme senyawa fenol sebagai antifungi yaitu berinteraksi dengan dinding sel fungi, dimana pada kadar yang rendah akan mendenaturasi protein dan pada kadar yang tinggi akan menyebabkan koagulasi protein sehingga sel akan mati (Siswandono dan Sukardjo, 1995). Tanin dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans* dengan mempengaruhi integritas dinding sel jamur karena berikatan dengan makromolekul

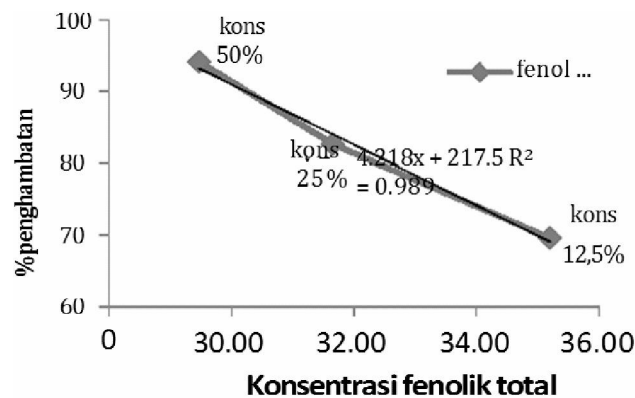
seperti protein dan polisakarida, menurunkan kemampuan melekat sel eukariot dengan permukaan, menghambat pembentukan *germ tube*, dan menstimulasi fagositosis (Ishida dkk, 2006).

Hasil penelitian (Tabel IV) terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi rebusan maka kandungan fenolik semakin menurun dan semakin besar persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *C. albicans*.

Penurunan kandungan fenolik total berarti pada penghambatan pertumbuhan *C. Albicans*



Gambar 3. Persentase penghambatan sample terhadap pertumbuhan *C.albicans*



Gambar 4. Korelasi antara kandungan fenolik total dengan penghambatan *C.albicans*

terbukti tidak hanya senyawa fenolik yang berperan. Penurunan kandungan fenolik dimungkinkan karena terjadi polimerisasi pada senyawa fenolik sehingga tidak terdeteksi oleh reagen Folin Ciocalteu. Semakin tinggi konsentrasi fenolik pada rebusan maka semakin banyak polimerisasi yang terjadi.

Koefisien determinasi (R^2) yang didapatkan dari korelasi antara kandungan fenol total dengan persentase penghambatan pertumbuhan *C. albicans* yaitu 0,989, berarti 98,9% kandungan fenol mempengaruhi persentase penghambatan pertumbuhan *C. albicans*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada drg. Harsini MS. yang telah memberikan ide dilakukannya penelitian ini sebagai data dasar penelitian selanjutnya dan atas dukungan finansial pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1985, Tanaman Obat Indonesia, Jilid I, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Chun, O.K., Kim, D.O., dan Lee, C.Y., 2003, Superoxide radical scavenging Activity of Major Polyphenols in Fresh Plums, *J. Agric.Food Chem.*, 51, 8068-8072
- Dalimartha, S., 2000, Atlas Tumbuhan obat Indonesia Volume 2, Trubus Agriwidya, Jakarta.
- Ezoubeiri, A., Gadhi C.A., Fdil N., Benharref A., Jana M. dan Vanhaelen M., 2005, Isolation and antimicrobial activity of two phenolics compounds from *Pulicaria odora* L., *J. Ethnopharmacol*, 99, 287-292.
- Ishida, K. dkk., 2006, Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *C. albicans*, *Journal ofAntimicrobi Chemotherapy*, 58, 942-949.
- Kannan, V.R., Sumathi, C.S., dkk., 2009, Elementary Chemical Profiling ang Antifungal Properties of

- Cashew (*Anacardium occidentale* L.) Nuts, *Botany Research International*, 2 (4), 253-257.
- Kozubek A., Zarnowski R., Stasiuk M., dan Gubernurator J., 2001, Natural Amphiphilic Phenols as Biofungicides, *Cell Mol. Biol. Lett.*, 6, 351-355.
- Lundin, S.A. dan Emilson, C.G., 1989, Microflora in Plaque from Aproximal Aosterior Composite Resin Restoration, *Quintessence Int*, 20, 413-416.
- Prithiviraj B., Singh U. P., Manickam M., dan Ray A. B., 1997, Antifungal activity of anacardic acid, a naturally occurring derivative of salicylic acid, *Canadian Journal of Botany*, 75 (1), 207-211.
- Samaranayake, L.P., Nikawa H, Nishimura H, Yamamoto T, dan Hamada T., 1995, Role of denture pellicle in *C. albicans* biofilm development in vitro, *Journal of Dental Research*, 74 (Special Issue), 447.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 1995, *Kimia Medisinal*, 257-259, Airlangga Press, Surabaya.
- Soenartyo dan Hadi, 2000, Denture Stomatitis : Penyebab dan Pengelolaannya, *Majalah kedokteran gigi*, 4 (33), 148-151.