

Research Report

Uji toksisitas ekstrak bawang putih (*Allium Sativum*) terhadap kultur sel fibroblast

(Garlic (*Allium Sativum*) extract toxicity test on fibroblast cell culture)

Yulie Emilda, Els Budipramana, dan Satiti Kuntari

Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Anak
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Surabaya – Indonesia

ABSTRACT

Background: Previous studies have found antimicrobial effect of garlic (*allium sativum*). Garlic has potential as sterilization material for root canal treatment. Nevertheless, such material has to be non toxic and has to have adequate biocompatibility. **Purpose:** The study was aimed to examine the toxicity of garlic (*allium sativum*) on fibroblast cell culture. **Method:** Toxicity test was conducted using 50%, 75%, 100% of garlic extract, and Chlorphenol Kamfer Menthol (ChKM) as control. BHK-21 cell-culture was put into microplate 96 wells with 2×10^5 densities and incubated in a 37°C. The garlic extracts in various concentration and ChKM were then placed into the wells. MTT assay test was then use to analyze toxicity, a 50% percentage of living culture-cell was set as a parameter whether the extract is toxic or not. **Results:** The results showed that in 50%, 75%, and 100% garlic concentration indicates a non toxic characteristic on fibroblast cell culture. The non toxic property was consistent in 72, 96, and 120 hours of observation point. **Conclusion:** The study revealed that garlic on consenstration of 50%, 75%, 100% did not show toxic effect on fibroblast culture cell, but it needs further research for preparing it as an alternative medicament of root canal treatment.

Key words: Garlic, *allium sativum*, toxicity, cell-culture, fibroblast

ABSTRAK

Latar belakang: Penelitian sebelumnya telah menemukan efek antimikroba bawang putih (*allium sativum*). Bawang putih memiliki potensi sebagai bahan sterilisasi pada perawatan saluran akar. Namun bahan tersebut harus tidak toksik dan memiliki biokompatibilitas yang memadai. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan menguji toksisitas bawang putih (*allium sativum*) terhadap kultur sel fibroblast. **Metode:** Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan konsentrasi 50%, 75%, 100% dari ekstrak bawang putih, dan Chlorphenol Kamfer Menthol (ChKM) sebagai kontrol. BHK-21 kultur sel dimasukkan ke dalam microplate 96 sumuran dengan kepadatan 2×10^5 dan diinkubasi di suhu 37°C. Ekstrak bawang putih dalam berbagai konsentrasi dan ChKM kemudian ditempatkan pada sumur dipersiapkan sebelumnya. MTT assay test kemudian digunakan untuk menganalisis toksisitas, persentase 50% dari kultur sel hidup digunakan sebagai parameter apakah ekstrak beracun atau tidak. **Hasil:** Hasil penelitian ini menunjukkan pada konsentrasi bawang putih 50%, 75%, 100% menunjukkan karakteristik non toksis terhadap kultur sel fibroblast. Kondisi non toksik konsisten di 72, 96, dan 120 jam pengamatan. **Simpulan:** Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 50,%, 75%, 100% tidak bersifat toksik terhadap kultur sel fibroblast, namun masih diperlukan pengujian lebih lanjut untuk dapat digunakan sebagai alternatif bahan sterilisasi saluran akar.

Kata kunci: Bawang putih, *allium sativum*, toksisitas, kultur sel, fibroblast

Korespondensi (correspondence): Yulie Emilda, Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Anak, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo no. 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: yulieemilda@yahoo.com.

PENDAHULUAN

Sterilisasi saluran akar merupakan tahap yang penting dalam perawatan endodontik.¹ Obat sterilisasi saluran akar yang digunakan saat ini dibagi menjadi 2 golongan yaitu obat non spesifik dan preparat poliantibiotik. Obat non spesifik adalah *Chlorphenol Kamfer Menthol* (ChKM), cresatin, cresophene, formokresol, Trikresol formalin (TKF), eugenol, *Camphorated Parachlorophenol* (CMCP). Preparat poliantibiotik adalah campuran beberapa macam antibiotik biasanya berupa pasta, yaitu penisilin, basitirin, streptomisin, sodium kaprilat dan kombinasi antibiotik dan kortikosteroid, contoh obat adalah ledermix, septomixine, terra cortil.²

Uji biologis menyatakan bahwa formocresol sangat toksik, mudah tersebar kedalam apeks gigi dalam waktu 15 menit, menyebabkan iritasi atau *bony sequestrum*. Demikian pula dengan *Camphorated parachlorophenol* walaupun lebih sedikit efek toksik pada jaringan periapikal dibandingkan dengan *formocresol*. Keduanya secara klinis diaplikasikan dalam bentuk cairan pada *cotton pellet* dan ditempatkan pada ruang pulpa dan akan berubah menjadi bentuk uap.³

Oleh karena efek toksisitas kebanyakan obat saluran akar yang ada dipasaran, saat ini penggunaan obat mengarah pada obat ekstrak biologis dari tumbuh-tumbuhan alami untuk mengurangi berbagai aktivitas toksisitas dari bahan kimia.³ Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa bawang putih memiliki efek antimikroba, menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif dan gram-positif seperti *Escherichia*, *Salmonella*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus* and *Helicobacter pylori*.⁴ Fani *et al.*,⁵ menguji sifat antibakteri ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 64%(w/v) terhadap *Streptococcus mutans*. Data *in vitro* yang diperoleh pada studi ini menyatakan bahwa ekstrak bawang putih secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan dari *S. mutans*. Lingga dan Rustama⁶ melakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak bawang putih terhadap isolate gram negatif *Clostridium sp*, *Corynebacterium sp*, *Plesiomonas sp*, *Vibrio sp*, dan isolate Gram positif *Bacillus sp*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp* dan *Erysipelothrix sp*. Rentang dosis yang digunakan adalah 25%, 50%, dan 75% berdasarkan perbandingan berat:berat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak bawang putih dengan berbagai pelarut dengan pengenceran tertinggi 75% lebih memberikan pengaruh terhadap bakteri-bakteri *Streptococcus sp*, *Clostridium sp* dan *Pseudomonas sp*.

Aktivitas antimikroba bawang putih dikaitkan dengan adanya *allicin* yang apabila hilang membuat bawang putih tidak aktif terhadap mikroorganisme. *Allicin* diperoleh dengan menghancurkan atau memotong siung bawang putih. Asam amino odorless, *alliin*, hadir dalam siung bawang putih, dimetabolisme oleh enzim *allinase* (sebuah *lyase sulfoxide sistein*) dengan *allicin* dan *thiosulfonates* lainnya, yang memiliki efek antimikroba dan menghasilkan bau yang khas dari *bawang putih*. *Allicin* bereaksi

menghambat sintesis RNA dan sebagian menghambat DNA dan sintesa protein dimana RNA merupakan target utama dari *allicin*.⁴

Sel fibroblast merupakan sel utama jaringan ikat yang terletak pada lamina propria mukosa rongga mulut, merupakan sel terpenting dan komponen terbesar dari pulpa, ligamen periodontal, dan gingival.⁷ Bahan-bahan yang masuk ke dalam rongga mulut harus bersifat tidak toksik, tidak mengiritasi dan harus mempunyai sifat biokompatibilitas atau bahan yang diproduksi tidak boleh mempunyai efek yang merugikan terhadap lingkungan biologis, baik lokal maupun sistemik.⁸ Untuk itu diperlukan penelitian untuk menguji toksisitas suatu bahan.

Penelitian ini dilakukan untuk meneliti efek toksisitas larutan ekstrak bawang putih terhadap kultur sel fibroblast. Uji toksisitas secara *in vitro* pada kultur sel BHK-21 menggunakan MTT assay. Kultur *cell lines* digunakan karena sel ini berasal dari embrio sehingga mudah tumbuh dan mudah dilakukan sub kultur ulang. *Cell lines* telah banyak digunakan untuk menguji toksisitas bahan dan obat-obatan di bidang kedokteran gigi, antara lain sel BHK-21 yang berasal dari fibroblast ginjal bayi *hamster*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100%, serta ChKM. Disiapkan pula kontrol sel sebagai kontrol positif berisi sel dalam media kultur, dianggap persentase sel hidup 100% dan kontrol media sebagai kontrol negatif berisi media kultur saja, dianggap persentase sel hidup 0%. Dalam laminar *flow*, ekstrak bawang putih diencerkan dengan media eagle's dan FBS sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan yaitu 50%, 75%, dan 100%. Ekstrak bawang putih yang telah diencerkan dan ChKM dimasukkan dalam mikropate 96 sumuran (menggunakan mikro pipet *single*), kemudian kultur sel diinkubasi pada masing-masing perlakuan yaitu 72 jam, 96 jam, 120 jam suhu 37° C. Kemudian dilakukan uji MTT pada kultur Sel. Nilai densitas optik formazan dihitung dengan Elisa reader pada panjang gelombang 630 nm. Makin pekat warnanya, makin tinggi nilai absorbansinya maka semakin banyak jumlah sel yang hidup. Persentase sel hidup dihitung dengan:⁸

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{Perlakuan} + \text{Media}}{\text{Sel} + \text{Media}} \times 100\%$$

Keterangan:

- % sel hidup : persentase jumlah sel hidup setelah pengujian
- perlakuan : nilai densitas optik formazan pada setiap sampel setelah pengujian
- media : nilai densitas optik formazan pada kontrol media
- sel : nilai densitas optik formazan pada kontrol sel

Data yang diperoleh dianalisa dengan *Independent t-test* untuk melihat perbedaan persentase sel hidup pada perbandingan antar kelompok penelitian.

HASIL

Berdasarkan hasil pengamatan dan penghitungan densitas jumlah sel fibroblast terhadap penggunaan ekstrak bawang putih, yang terbagi atas 4 kelompok penelitian, yaitu kelompok konsentrasi 50%, 75%, 100%, dan ChKM, didapatkan hasil sebagai berikut: Ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 50%, 75%, 100%, selama 72 jam, 96 jam, dan 120 jam tidak menunjukkan adanya toksisitas (Tabel 1). Hasil uji statistik tampak pada Tabel 2, 3 dan 4. Terlihat adanya kecenderungan peningkatan rata-rata densitas jumlah sel fibroblast yang menggambarkan jumlah sel yang hidup, pada kelompok konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak bawang putih maka semakin tinggi rata-rata densitas jumlah sel fibroblast. Pada kelompok kontrol ChKM didapatkan rata-rata densitas jumlah sel fibroblast dengan nilai yang paling rendah (Gambar 1, 2, 3).

Tabel 1. Rata-rata dan standar deviasi jumlah sel fibroblast yang hidup pada setiap kelompok penelitian setelah 72 jam, 96 jam dan 120 jam

Hari (jam)	Kelompok	Rerata	Standar Deviasi
Tiga (72 jam)	50%	0,97000	0,050236
	75%	1,07791	0,044496
	100%	1,62665	0,092523
	ChKM	0,86736	0,028064
Empat (96 jam)	50%	0,91999	0,047930
	75%	1,00943	0,039965
	100%	1,49951	0,064746
	ChKM	0,75298	0,273543
Lima (120 jam)	50%	0,91478	0,052844
	75%	0,99155	0,043756
	100%	1,46949	0,121242
	ChKM	0,86458	0,030368

Tabel 2. Uji beda antara masing-masing kelompok penelitian menggunakan Independent t-test setelah 3 hari (72 jam)

Tiga hari (72 jam)	50%	75%	100%	ChKM
50%	-	0,000*	0,000*	0,000*
75%		-	0,000*	0,000*
100%			-	0,000*
ChKM				-

*=terdapat perbedaan yang signifikan (p<0,05).

Tabel 3. Uji beda antara masing-masing kelompok penelitian menggunakan Independent t-test setelah 4 hari (96 jam)

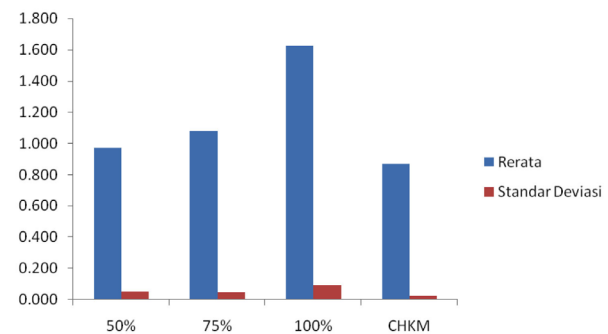
Empat hari (96 jam)	50%	75%	100%	ChKM
50%	-	0,001*	0,000*	0,111
75%		-	0,000*	0,020*
100%			-	0,000*
ChKM				-

*=terdapat perbedaan yang signifikan (p<0,05).

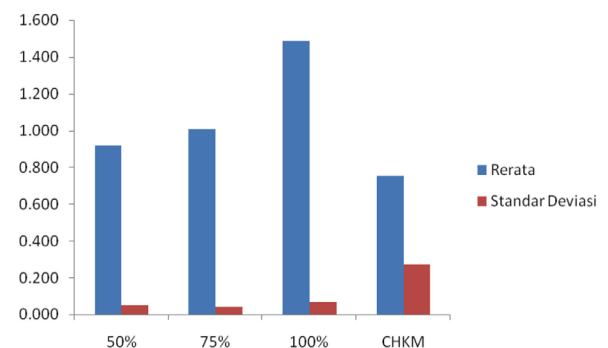
Tabel 4. Uji beda antara masing-masing kelompok penelitian menggunakan Independent t-test setelah 5 hari (120 jam)

Lima hari (120 jam)	50%	75%	100%	ChKM
50%	-	0,007*	0,000*	0,035*
75%		-	0,000*	0,000*
100%			-	0,000*
ChKM				-

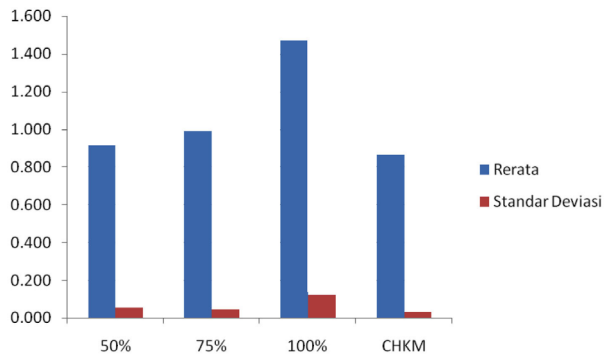
*=terdapat perbedaan yang signifikan (p<0,05).



Gambar 1. Grafik rata-rata dan standar deviasi jumlah sel fibroblast yang hidup dihari ketiga (72 jam).



Gambar 2. Grafik rata-rata dan standar deviasi jumlah sel fibroblast yang hidup dihari keempat (96 jam).



Gambar 3. Grafik rata-rata dan standar deviasi jumlah sel fibroblast yang hidup dihari kelima (120 jam).

PEMBAHASAN

Terlihat adanya kecenderungan peningkatan rata-rata densitas jumlah sel fibroblast yang menggambarkan jumlah sel yang hidup, pada kelompok konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak bawang putih maka semakin tinggi rata-rata densitas jumlah sel fibroblast. Pada kelompok kontrol ChKM didapatkan rata-rata densitas jumlah sel fibroblast dengan nilai yang paling rendah. Terdapat perbedaan yang signifikan di antara keempat kelompok tersebut, artinya peningkatan kepekatan ekstrak bawang putih menimbulkan perbedaan yang signifikan terhadap viabilitas sel fibroblast. Tidak ada perbedaan yang signifikan antara ekstrak bawang putih konsentrasi 50% dengan ChKM pada hari keempat. Pada kelompok ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 50% didapatkan persentase jumlah sel yang hidup adalah 97% pada hari ketiga, 92% pada hari keempat, dan 91,48% pada hari kelima. Walaupun nilai tersebut tidak menunjukkan toksisitas, namun terdapat sel yang mengalami kematian.

Pengaruh yang ditimbulkan terhadap viabilitas sel fibroblast berupa perubahan permeabilitas membran sel. Efek toksisitas dari sitotoksin dapat menyebabkan terjadi perubahan permeabilitas membran sel atau kerusakan integritas membran sel sehingga membran selnya bisa ditembus oleh *trypan blue*.⁷ Kerusakan pada membran sel dapat menyebabkan sel menjadi non viabel, dan selanjutnya dapat menyebabkan kematian sel. Pada sel yang non-viabel membran selnya bisa ditembus oleh *trypan blue* sedangkan sel yang viabel memiliki membran sel yang impermeabel terhadap *trypan blue*. Jadi semakin besar pengaruh yang ditimbulkan akan mengakibatkan semakin banyak sel mati, yang juga berarti persentase kematian sel semakin meningkat.

Terdapat beberapa mekanisme biokimiawi yang diduga memperantarai kematian sel, hal ini dapat menjelaskan terjadinya kematian sel sehubungan dengan toksisitas suatu bahan. Mekanisme biokimia tersebut antara lain: penipisan kadar Adenosin Triphosphate (ATP) dan defek pada membran sel. Enzim dehidrogenase adalah salah satu enzim yang berperan dalam pembentukan ATP, yaitu

suatu bentuk energi yang sangat dibutuhkan oleh sel untuk berbagai aktivitas fungsional sel. Jika enzim dehidrogenase tidak aktif akibat efek sitotoksik suatu sitotoksin, maka ATP berkurang, aktivitas sel terganggu, sehingga dapat mengakibatkan kematian sel. Kerusakan membran atau hilangnya permeabilitas membran selektif merupakan gambaran umum jejas sel. Defek ini bisa mempengaruhi mitokondria yang merupakan tempat untuk memproduksi ATP.⁹

Prinsip umum mengenai jejas sel yang memiliki kemungkinan sebagai penyebab adanya perbedaan pengaruh pada kelompok penelitian tersebut, antara lain: 1) beberapa komponen atau sistem intraseluler sel sensitif atau mudah mengalami jejas antara lain: membran sel (integritas membran sel), sistem respirasi aerob (mitokondria, enzim), komponen genetic; 2) respon seluler terhadap stimuli jejas tergantung pada jenis jejas, lama stimuli jejas dan berat ringannya stimuli jejas. Jenis jejas dibedakan berdasarkan penyebab jejas sel, seperti bahan kimia dan obat-obatan, hipoksia, dan lainnya. Lama stimuli jejas berhubungan dengan waktu paparan, sedangkan berat ringannya stimuli berkaitan dengan dosis ataupun konsentrasi paparan.^{9,10}

Terjadinya proliferasi sel pada ekstrak bawang putih konsentrasi 100% bisa disebabkan karena penggunaan kultur sel fibroblast yang terlalu tebal yaitu dengan kepadatan 2×10^5 . Persentase sel hidup yang meningkat, yang ditunjukkan dengan nilai densitas optik formazan yang meningkat menunjukkan bahwa sel fibroblast mampu mempertahankan integritas membran sel sehingga sel tidak mengalami kematian. Semakin besar nilai densitas optik formazan, semakin banyak jumlah sel yang hidup. Kemampuan sel mempertahankan permeabilitas sel ini besar kemungkinan disebabkan karena adanya kandungan senyawa kimia aktif yang didapatkan pada bawang putih yang dapat menstimulasi proliferasi sel fibroblast.

Pada penelitian ini terjadi proliferasi sel fibroblast. Salah satu kandungan senyawa dalam bawang putih adalah *Diallyl disulfida*. *Diallyl disulfida* dalam bawang putih mampu menguraikan protein pada sel yang rusak sehingga protein tersebut mudah dicerna oleh tubuh dan mampu meningkatkan kekebalan non-spesifik melalui aktivitas fagositosis dan merangsang aktifitas sel yang berperan dalam respons imunitas.¹¹ Flavanoid yang terkandung dalam bawang putih memiliki sifat dapat menumbuhkan jaringan, menghambat respon inflamasi dengan cara menghambat siklus lipooksigenase yang menghasilkan prostaglandin.¹² Konsentrasi fenol yang rendah dari beberapa senyawa fenol menstimulasi proliferasi sel fibroblast pulpa manusia. Fenomena ini dikenal sebagai hormesis dan berkontribusi dalam memperbaiki jaringan pulpa. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 50%, 75%, 100%, tidak bersifat toksik terhadap kultur sel fibroblast, namun masih diperlukan pengujian lebih lanjut untuk dapat digunakan sebagai alternatif bahan sterilisasi saluran akar.

DAFTAR PUSTAKA

1. Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE. Preparasi saluran akar: peralatan dan teknik pembersihan, pembentukan, dan irigasi, desinfeksi saluran akar in Ilmu endodontik dalam praktek. Editor Suryo S. 11th ed. Jakarta: EGC; 1995. h. 196, 248-53.
2. Tarigan R. Medikamen pada endodontia in perawatan pulpa gigi (endodontia). 1st ed. Jakarta: Widya Medika; 1994, p.71-5.
3. Zied STA, Eissa, Somaia AL. Comparative study on antibacterial activities of two natural plants versus three different intracanal medications. Endodontic Departement, Faculty of Oral and Dental Medicine, Cairo University; 2011. p. 1-2.
4. Eja ME, Asikong BE, Abriba C, Arikpo GE, Anwan EE, Enyi-Idoh KH. A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*allium sativum*) and antibiotics on diarrheagenic organism. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2007; 38(2): 343-8.
5. Fani MM, Kohanteb J, Dayaghi M. Inhibitory of garlic (*allium sativum*) on multidrugs-resistant streptococcus mutans. J Indian Soc Pedod Prevent Dent 2007; 25(4): 164-8.
6. Lingga ME, Rustama MM. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak air dan etanol bawang putih (*Allium sativum*) terhadap Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif yang diisolasi dari udang Dogol (*Metapenaeus monoceros*), Udang Lobster (*Panulirus sp*), dan Udang rebon (*Mysis dan Acetes*). Available from http://pustaka.unpad.ac.id/wpcontent/uploads/2009/12/uji_aktivitas_antibakteri.pdf. Accessed March 27, 2011.
7. Freshney RI. A manual of basic technique in culture of animal cells. 2th ed. New York: Alan R Liss Inc; 1992. p. 227-45.
8. Meizarini A. Sitoksisitas bahan restorasi cyanoacrylate pada variasi perbandingan powder dan liquid menggunakan esei MTT. Maj. Ked. Gigi (Dent J) 2005; 38(1): 20-4.
9. Cotran R, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA: WB Saunders Company; 1999. p. 4-15, 102-10.
10. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 1999; 12(4): 564-82.
11. Nuryati S, Giri P, Hadiroseyani Y. Efektivitas ekstrak bawang putih *allium sativum* terhadap ketahanan tubuh ikan mas cyprianus carpio yang diinfeksi Koi Herpes Virus (KHV). Jurnal Akuakultur Indonesia 2008; 7(2): 139-50.
12. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS. Mechanism involved in the antiinflammatory effects of propolis extract. Drugs Exp Clin Res 1993; 19(5): 197-203.