

EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI NANO KITOSAN TERHADAP PERTUMBUHAN *Staphylococcus aureus* (in vitro)

Antibacterial Activity of Nano Chitosan on Staphylococcus aureus

Ade Komariah

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti
E-mail: akomariah@gmail.com

Abstract- Mouth is considered as a not homogeneous environment. These following aspects may caused a significant contribution towards the cause of infection namely; the mucosal surfaces in the mouth and teeth are not the same, has warm temperatures, moisture and nutrient-rich environment which increasing the growth of microorganisms. *Staphylococcus aureus* can trigger the occurrence of infectious diseases, which is acute apical abscess. Nano chitosan is a physical modification of chitosan which posses antibacterial capability. The purpose of this study to test the effectiveness of antibacterial nano chitosan in different degree of deacetylation and concentrations against *Staphylococcus aureus*. This experimental study was conducted with disc's method and using some concentration of 90%, 45%, 22,5%, 11,25%, 5,625%, 2,812%, 1,406%, 0,703%, 0,351%, 0,175% and 2 control groups, namely positive and negative controls. The statistical analysis using Chi - Square manually. The test results of antibacterial activity against *S. aureus* is the Minimum Inhibitory concentration (MIC) of nano chitosan DD 89% and 93% at a concentration of 22.55%. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) nano chitosan DD 89% is at a concentration of 45% , while the nano chitosan DD 93% at a concentration of 22.5% . The results of statistical tests showed there are differences of MIC and MBC at different concentrations but there is no difference on different the degree of deacetylation test.

Keywords: Antibacterial, Nano chitosan, *S.aureus*, MIC, MBC

PENDAHULUAN

Mulut merupakan lingkungan yang tidak homogen, karena permukaan mukosa dan gigi dalam mulut yang tidak sama serta temperatur yang hangat, kelembaban dan lingkungan yang kaya akan nutrisi yang dapat meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme, sehingga dapat memberikan kontribusi yang cukup berarti dalam menimbulkan infeksi.

Menurut Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) yang dilakukan Kementerian Kesehatan RI pada tahun 2011, menunjukkan penyakit gigi dan mulut merupakan penyakit tertinggi ke-6 yang dikeluhkan masyarakat Indonesia. Ini dibuktikan dengan adanya 60% penduduk Indonesia masih mengalami penyakit gigi dan mulut.¹

Bakteri merupakan salah satu pemicu terjadinya suatu infeksi dengan cara menginvasi dan berkembang biak dalam jaringan tubuh atau rongga mulut, baik bakteri aerob dan bakteri anaerob. Salah

satu bakteri aerob yang dapat menyebabkan infeksi gigi dan mulut adalah *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus adalah bakteri dalam rongga mulut yang berpeluang paling besar dalam menyebabkan penyakit. Bakteri ini sering dihubungkan dengan inflamasi dan pembentukan abses. Abses adalah pengumpulan eksudat purulen yang terjebak di dalam jaringan yang terjadi akibat infeksi bakteri. Abses apikalis akut adalah suatu lesi likuifaksi atau difus yang menghancurkan jaringan periradikuler. Ini adalah respons inflamasi yang parah terhadap iritan mikroba dan non bakteri dari pulpa nekrotik. Salah satu perawatan yang baik dalam menangani abses adalah melakukan drainase. Pemilihan cairan irigasi pada saat drainase mempengaruhi kecepatan penyembuhan. Cairan irigasi yang baik dapat membantu menghambat pertumbuhan bakteri didalamnya.²



Pada sebagian kasus infeksi, penggunaan antibiotik sangat diperlukan, tetapi bila berlebihan dapat menyebabkan beberapa bakteri resisten atau bertahan hidup karena adanya perubahan genetik. Salah satu contohnya yaitu : *S. aureus* yang tergolong bakteri gram positif resisten terhadap penisilin, nafsilin dan vankomisin. Oleh karena itu, perlu dicari alternatif lain dengan pemanfaatan sumber biomaterial alam, karena penggunaan bahan alami relatif lebih dapat diterima tubuh dibandingkan dengan dengan bahan-bahan sintesis.

Saat ini telah banyak dilakukan penelitian terhadap suatu senyawa yang berasal dari proses ekstraksi limbah cangkang hewan laut seperti krustasea yang disebut kitosan. Kulit udang dan kepiting merupakan bahan baku penghasil kitin. Indonesia merupakan negara maritim yang mempunyai potensi cukup besar sebagai penghasil jenis ikan dan hewan laut lainnya seperti udang dan kepiting. Ini dibuktikan dengan Pusat Data, Statistik dan Informasi Departemen Kelautan dan Perikanan tahun 2008 menunjukkan ekspor udang Indonesia meningkat menjadi 160.797 ton pada tahun 2007.³ Disamping itu hasil penelitian lain menyebutkan bahwa kitin yang terkandung dalam limbah cangkang udang sebesar 24,3% dari berat keringnya.⁴

Kitosan memiliki peran dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme, termasuk mikroorganisme patogen di dalam mulut. Selain itu kitosan memiliki banyak manfaat seperti sebagai bahan antibakteri dalam bentuk formulasi gel pembersih tangan,⁵ bahan pengawet,⁶ sebagai pengisi dalam pembuatan sabun transparan,⁷ serta dapat mempercepat penyembuhan luka dengan sifatnya yang mampu meningkatkan proliferasi fibroblast.⁸ Kitosan juga telah digunakan secara luas dalam bidang pengobatan, menjadi bahan yang penting

dalam aplikasi farmasi, karena mempunyai kemampuan *biodegradasi* dan *biocompatibility* dan non toksik.⁹ Kitosan juga memperlihatkan aktivitas biologi seperti *hypocholesterolemic*, antimikroba, dan anti jamur.¹⁰

Penelitian kitosan banyak dilakukan dengan memodifikasi baik secara kimia dengan meningkatkan derajat deasetilasi, maupun secara fisik dengan mengubah bentuk ukuran dari kitosan yaitu dalam bentuk nano partikel. Aplikasi nanoteknologi membuat revolusi baru dalam dunia industri, nanoteknologi meliputi usaha dan konsep untuk menghasilkan material atau bahan berskala nanometer, mengeksplorasi dan merekayasa karakteristik material atau bahan tersebut, serta mendesain ulang ke dalam bentuk, ukuran dan fungsi yang diinginkan.

Nano kitosan adalah nano partikel dari kitosan yang memiliki daya serap lebih baik dan kemampuan yang lebih baik sebagai antibakteri dan antijamur daripada kitosan dengan ukuran biasa,¹¹ maka dari itu masih diperlukan dilakukan penelitian nano kitosan terutama yang berkaitan dengan bidang kesehatan gigi dan mulut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan kitosan dengan dilakukannya perubahan bentuk fisik menjadi bentuk nano partikel pada derajat deasetilasi dan konsentrasi berbeda dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan *S. aureus*.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan dari cangkang udang dan rajungan, *Staphylococcus aureus*. Brain heart infusion (BHI), Media padat agar darah tabung, aquades, aqua destilata, alkohol, Mc Farland 0,5. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *beaker glass*, timbangan digital, gelas ukur,



kertas pH, kompor listrik, saringan, alat pengaduk, termometer, *magnetic stirrer*, pipet, *spray dryer*, alat uji FTIR, uji PAS, magnetic stirrer, magnetic bar, neraca digital, pH universal, yellow tip dan white tip, tabung steril, pipet pengencer eppendorf, mikropipet, incubator, autoklaf, vortex, spektrofotometer, analisis FTIR (Fourier Transform Infra Red), and analisis PSA (Particle Size Analyzer)

Lingkup Penelitian

Komposisi kimia kitosan hasil deasetilasi kitin diketahui dengan analisis proksimat (AOAC 1995), pengukuran derajat deasetilasi menggunakan FTIR dan sebaran ukuran nano kitosan di analisis menggunakan PAS. Penelitian aktifitas nano kitosan terhadap daya hambat (KHM) dan daya bunuh (KBM) pada pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dilakukan secara invitro, dengan menggunakan metode dilusi bertingkat, hasil pengamatan nano kitosan terhadap daya hambat pertumbuhan *S. aureus* dilihat dengan ada tidaknya kekeruhan, sedangkan pengamatan daya bunuh nano kitosan terhadap *S. aureus* dalam media agar darah dilakukan dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nano kitosan yang diperoleh menggunakan *magnetic stirrer*, karena dengan alat *magnetic stirrer* memiliki kelebihan yaitu proses homogenisasi antara kitosan serbuk awal dengan bahan gelas ionik, dapat dikendalikan secara merata dengan kecepatan yang tinggi, dibanding menggunakan alat lainnya, sehingga lebih efektif menghasilkan nanopartikel. Nanopartikel kitosan yang dihasilkan dianalisis menggunakan *Particle Size Analyzer* (PAS), diperoleh rata-rata ukuran nano kitosan sebesar 300 nm. Ukuran nano partikel kitosan dalam penelitian ini sesuai dengan Mohanraj dan

Chen 2006 yang menyatakan nanopartikel adalah butiran atau partikel padat dengan kisaran ukuran 10 - 1000 nm.¹² Derajat deasetilasi menggunakan *Fourier Transform Infra Red*(FTIR), diperoleh derajat deasetilasi rajungan sebesar 89% tahun 2011,¹³ hasil penelitiannya dan udang sebesar 93%.

Modifikasi bentuk fisik kitosan menjadi nanopartikel, dilakukan agar dapat mengoptimalkan efektifitas kitosan sebagai antibakteri. Hal ini didukung dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Luis E pada menyatakan bahwa semakin kecil ukuran partikel kitosan, maka semakin tinggi aktifitas antibakteri dari kitosan tersebut. Meskipun tidak memiliki gambaran yang jelas tentang mekanisme efek ukuran partikel pada aktivitas antimikroba kitosan nanopartikel, namun dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pada partikel yang lebih besar memiliki kemampuan merusak membran sel yang lebih rendah daripada kitosan dengan partikel yang berukuran lebih kecil.¹⁴

Diantara berbagai metode pembuatan nanopartikel kitosan, gelas ionik merupakan metode yang banyak menarik perhatian peneliti dikarenakan prosesnya yang sederhana, tidak menggunakan pelarut organik, dan dapat dikontrol dengan mudah.

Berdasarkan hasil pengamatan daya hambat (KHM) pada kelompok perlakuan dengan derajat deasetilasi 89 %, serta kontrol positif dan negatif yang diamatiselama 18-24 jam pada suhu 37 °C dapat dilihat pada Tabel 1.

Analisis *Chi-Square* KHM terhadap masing-masing konsentrasi pada nano kitosan DD 89%, menyatakan ada hubungan antara perlakuan konsentrasi dengan pertumbuhan *S. aureus*. Nano kitosan DD 89% dengan konsentrasi tinggi, lebih menghambat pertumbuhan *S. aureus* daripada konsentrasi rendah. Hal ini



memiliki arti bahwa konsentrasi 90%, 45%, dan 22,5%, tidak memiliki perbedaan dalam mempengaruhi pertumbuhan *S. aureus*, namun memiliki perbedaan dengan konsentrasi 11,25%,

5,625%, 2,812%, 1,406%, 0,703%, 0,351%, dan 0,175%. Dari pengamatan dilusi medium cair BHI pada DD 89% didapatkan nilai KHM pada konsentrasi 22,5%.

Tabel 1. Pengamatan KHM Nano Kitosan dengan DD 89 % terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada media cair BHI

Replikasi	90%	45%	22,5%	11,25%	5,625%	2,812%	1,406%	0,703%	0,351%	0,175%	K (+)	K (-)
1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Keterangan + : Terdapat pertumbuhan kuman - : Tidak terdapat pertumbuhan kuman

Analisis *Chi-Square* KHM terhadap masing-masing konsentrasi KHM pada nano kitosan DD 93%, menyatakan ada hubungan antara perlakuan konsentrasi dengan pertumbuhan *S. aureus*. Nano kitosan DD 93% dengan konsentrasi tinggi lebih menghambat pertumbuhan *S. aureus* daripada konsentrasi rendah. Hal ini memiliki arti bahwa

konsentrasi 90%, 45%, dan 22,5%, tidak memiliki perbedaan dalam mempengaruhi pertumbuhan *S. aureus*, namun memiliki perbedaan dengan konsentrasi 11,25%, 5,625%, 2,812%, 1,406%, 0,703%, 0,351%, dan 0,175%. Nilai KHM nano kitosan DD 93% terjadi pada konsentrasi 22,5% (Tabel 2).

Tabel 2. Pengamatan KHM Nano Kitosan dengan DD 93 % terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada media cair BHI

Replika si	90%	45%	22,5%	11,25%	5,625%	2,812%	1,406%	0,703%	0,351%	0,175%	K (+)	K (-)
1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Keterangan +: terdapat pertumbuhan kuman -: tidak terdapat pertumbuhan kuman

Analisis *Chi-Square* KBM terhadap masing-masing konsentrasi pada nano kitosan DD 89%, menyatakan ada hubungan antara perlakuan konsentrasi dengan pertumbuhan *S. aureus*. Nano kitosan dengan konsentrasi

tinggi lebih membunuh pertumbuhan *S. aureus* daripada konsentrasi rendah. Nilai KBM nano kitosan DD 89% terdapat pada konsentrasi 45% (Tabel 3)

Tabel 3. Pengamatan KBM Nano Kitosan dengan DD 89% terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada media agar darah.

Replikasi	90%	45%	22,5%	11,25%	5,625%	2,812%	1,406%	0,703%	0,351%	0,175%	K (+)	K (-)
1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Keterangan: +: Terdapat Pertumbuhan Kuman, -: Tidak terdapat pertumbuhan kuman



Hasil analisis *Chi-Square* KBM terhadap masing-masing konsentrasi pada nano kitosan DD 93%, memperlihatkan adanya hubungan antara perlakuan konsentrasi dengan pertumbuhan *S. aureus*.

Nano kitosan dengan konsentrasi tinggi, lebih membunuh pertumbuhan *S. aureus* daripada konsentrasi rendah, dengan nilai KBM nano kitosan DD 93% terdapat pada konsentrasi 22,5% (Tabel 4).

Tabel 4. Pengamatan KBM Nano Kitosan dengan DD 89% terhadap pertumbuhan *S. aureus* pada media agar darah.

Replikasi	90%	45%	22,5%	11,25%	5,625%	2,812%	1,406%	0,703%	0,351%	0,175%	K (+)	K (-)
1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Keterangan: +: Terdapat Pertumbuhan Kuman, - : Tidak terdapat pertumbuhan kuman

Berdasarkan hasil penggoresan seri dilusi dengan masing masing konsentrasi KHM pada media padat, memperlihatkan bahwa semakin besar kandungan konsentrasi nano kitosan, maka semakin sedikit koloni yang tumbuh. Hal ini berlaku sebaliknya, semakin kecil kandungan konsentrasi nano kitosan maka semakin banyak koloni yang tumbuh. Hasil ini juga memperkuat bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak nano kitosan maka semakin besar pula konsentrasi bahan aktif yang berpengaruh terhadap pertumbuhan *S. aureus*.

Hasil penelitian ini didukung oleh hasil penelitian Setyahadi (2006)¹⁴, menyatakan interaksi antara kitosan dengan membran sel terluar dari bakteri, dimana konsentrasi berpengaruh terhadap daya antibakteri yaitu semakin tinggi konsentrasi maka daya hambat terhadap bakteri semakin besar. Berdasarkan hasil penelitian lain, menyatakan bahwa semua aktivitas antibakteri kitosan semakin menurun seiring peningkatan konsentrasi kitosan, penghambatan yang lebih tinggi pada kitosan konsentrasi rendah, diduga karena viskositas larutan yang lebih rendah.¹⁵

Mekanisme antimikroba kitosan terhadap bakteri terjadi melalui dua teori.

Teori yang pertama didasari oleh adanya gugus fungsional amina pada kitosan yang dapat membentuk ikatan dengan dinding sel bakteri dan mengakibatkan timbulnya kebocoran konstituen intraseluler sehingga bakteri akan lisis. Teori kedua menyebutkan bahwa diawali dengan merusak dinding sel bakteri, kitosan melakukan pengikatan intraseluler, menghalangi mRNA, dan menghambat sintesis protein.¹⁶

Analisis *Chi-Square* KHM dan KBM terhadap nano kitosan DD 89% dan DD 93%, diperoleh nilai $X^2 \leq 3,8415,05$, maka H_0 diterima. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara perlakuan DD 89% dengan DD 93% dalam menghambat serta membunuh *S. aureus*. Hasil penelitian ini didukung oleh Luis.¹³, yang menyatakan bahwa perbedaan derajat deasetilasi kitosan dalam bentuk nano partikel tidak mempengaruhi aktifitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri, namun hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Khan³⁹, yang menyatakan semakin tinggi derajat deasetilasi maka semakin banyak jumlah gugus amina pada kitosan, sehingga jumlah gugus amina yang terprotonasi dalam kondisi asam juga meningkat dan akhirnya dapat larut sempurna, selain itu akan meningkatkan peluang kitosan

berinteraksi dengan muatan negatif pada dinding sel mikroorganisme.

KESIMPULAN

Konsentrasi hambat minimum (KHM) nano kitosan DD 89% dan 93% terhadap bakteri *S. aureus* adalah pada konsentrasi 22,5 %. Untuk konsentrasi bunuh minimum (KBM) DD 89% terhadap bakteri *S. aureus* adalah pada konsentrasi 45%, sedangkan pada nano kitosan DD 93% pada konsentrasi 22,5%. Hasil penelitian ini memperlihatkan adanya efektivitas yang berbanding terbalik antara konsentrasi nano kitosan terhadap pertumbuhan *S. aureus*. Semakin tinggi konsentrasi nano kitosan, maka semakin rendah pertumbuhan *S. aureus*. Kitosan dengan derajat deasetilasi yang berbeda memperlihatkan tidak adanya perbedaan dalam menghambat pertumbuhan *S. Aureus*, meskipun terdapat perbedaan dalam pengamatan.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Hasan A. 2014. Cara merawat gusi gigi. [cited 2014 January 20]. Available : <http://sehatdanmurah.blogspot.com/2014/01/cara-merawat-gusi-gigi.html>
- ²Walton RE, Torabinejad M. 2008. Prinsip dan praktik ilmu endodonsia. Ed. ke-3. Jakarta : EGC; 2008 ; 49.
- ³Kencana A. 2009. Perlakuan sonikasi terhadap kitosan: viskositas dan bobot molekul kitosan. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- ⁴No HK, Lee SH, Park NY, Meyers SP. 2003. Comparison of physicochemical, Binding and Antibacterial Properties of Chitosans Prepared Without and With Deproteinization Process, *J. Agric. Food. Chem* 51: 7659-7663.
- ⁵Rahman A. 2012. Kitosan sebagai bahan antibakteri alternative dalam formulasi gel pembersih tangan (hand sanitizer). *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- ⁶Zheng, LY, Zhu JF. 2002. Antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *carbohydrate polymers* ;527-530.
- ⁷Amin H. 2006. Kajian penggunaan kitosan sebagai antibakteri dalam pembuatan sabun transparan. *Skripsi*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- ⁸Makmur AA, Suryono. 2011. Efektivitas kitosan cangkang udang galah (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) terhadap Proliferasi Sel Fibroblast Gingiva (Uji In-Vitro) [skripsi]. *Skripsi*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- ⁹Berger J, Reist M, Mayera JMO, Feltb NA, Peppas R, Gurny. 2004. Structure and interaction in covalently and ionocally crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharm And BioPharm* 2004;57: 19-34.
- ¹⁰Rhoades J, Roller S. 2000. *Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organism in laboratory media and foods*. American Society for Microbiology 2000;80-86.
- ¹¹Karmelia S. 2009. Pengaruh derajat deasetilasi nano kitosan untuk menyerap ion Zn²⁺ dari limbah cair industri karet. *Tesis*. Sekolah pascasarjana universitas sumatera utara. Medan.
- ¹²Mohanraj UJ and Chen Y. Nanoparticles - A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2006; 5 (1): 561-573.
- ¹³Luis E, et al. Antimicrobial effect of Chitosan nano particles on streptococcus mutans biofilm, *J applied and environmental microbiology* 2011; 77(1) : 3892-3895
- ¹⁴Yudiantoro S. Rizal, Nurainy F. Uji aktivitas Kitosan Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Makanan dengan Metode Sumur. *Skripsi*. Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Lampung. 2007.
- ¹⁵Setyahadi S. Pengembangan Produksi Kitin Secara Mikrobiologi, *Prosiding Seminar nasional Kitin Kitosan*, Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu kelautan IPB. Bogor; 2006; 33 -39
- ¹⁶Andreas Y, et al. Antibacterial Effect of Chitosan Powder : Mechanisme of Action. *Environ Technol* 2007;28;12 ;1357-1363.



TANYA JAWAB

Yang menjadi ukuran "Nano Kitosan" dalam penelitian ini apakah dengan modifikasi struktur bagian dalam dari senyawa kitosan ataukah permukaan fisik dari senyawa kitin tersebut. Apakah kisaran ukuran nano sudah tercapai?

Apa yang dimaksud dengan Netralisasi dalam proses identifikasi kitosan?

Jawab: modifikasi dari ukuran serbuk yang agak besar ke serbuk kecil, dari polimer dipotong menjadi polipeptida, nano kitosan berinteraksi dengan bakteri, dan ukuran struktur nanokitosan mencapai ukuran 300 nm dimana masih dalam range sebagai nano kitosan, Netralisasi untuk menghindari toksisitas, dengan menggunakan bahan kimia dengan aquades memakan satu minggu hingga terbentuk pH netral.

Bagaimana cara menggunakan proses teknologi nano?

Mengapa lebih memilih menggunakan kitin pada udang daripada dengan rajungan padahal rajungan memiliki banyak kitin lebih banyak?

Apa ciri penyakit abses/kesehatan mulut?

Jawab: Pembuatan nano dalam bentuk serum, dalam penelitian ini bahan kitin yang digunakan dari serangga, dengan persentase kitin 48%, rajungan memiliki kitin yang besar tetapi kitin lebih kecil dibandingkan serangga, serangga yaitu kumbang badak. Penyakit abses yaitu penyakit yang ada dirongga mulut (kalis).

