

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Periodontitis

2.1.1 Definisi



Gambar 2.1 A. Gambar Klinis Gingiva Normal, B. Gambar Klinis Periodontitis, C. Gambar Radiografi Periodontitis (Carranza *et al.*, 2012)

Periodontitis adalah suatu penyakit peradangan jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh kelompok mikroorganisme tertentu, yang mengakibatkan penghancuran progresif ligamentum periodontal dan tulang alveolar dengan pembentukan poket, resesi atau keduanya. Perbedaan antara periodontitis dan gingivitis adalah terjadinya kehilangan perlekatan jaringan periodontal yang disertai dengan menurunnya densitas tulang alveolar pada periodontitis. Periodontitis dibagi menjadi tiga, yaitu periodontitis agresif, periodontitis kronis,

dan periodontitis menifestasi penyakit sistemik. Periodontitis agresif sering menyerang pasien dengan usia muda, mulai usia 10 sampai dengan 30 tahun. Periodontitis agresif merusak ligament periodontal dan tulang alveolar secara luas dan parah dalam waktu yang singkat. Periodontitis Kronis terjadi pada usia dewasa yaitu usia 35 tahun keatas, dengan perjalanan penyakit yang lambat. (Carranza *et al.*, 2012).

2.1.2 Etiologi

Faktor etiologi utama dari periodontitis adalah biofilm pada mikroorganisme. Bakteri periodontopatogen Gram negatif yang telah diketahui dapat menyebabkan periodontitis meliputi: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga spp* dan *Campylobacter rectus* (Kesic *et al.*, 2008).

Penyebab penyakit periodontitis terbagi berdasarkan klasifikasi penyakit ini, yaitu periodontitis kronis dan periodontitis agresif. Akumulasi plak pada gigi dan permukaan gingiva di *dentogingival junction* adalah agen primer dalam etiologi periodontitis kronis, selain itu penyakit diabetes dapat meningkatkan dan memperberat periodontitis. Sedangkan pada periodontitis agresif bukti telah menunjukkan bahwa bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mempunyai frekuensi yang sangat tinggi sebagai penyebabnya (90%), terutama pada periodontitis agresif lokal (Carranza *et al.*, 2012)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans dapat memproduksi beberapa faktor virulensi yang bertindak secara lokal dalam sulkus. Faktor virulensi tersebut mengakibatkan kerusakan jaringan (Kler dan Malik, 2010) serta bersifat patogen

opportunistik. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bagian flora normal yang berkolonisasi di mukosa rongga mulut, gigi dan orofaring (Forbes *et al.*, 2007).

2.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans merupakan salah satu flora normal rongga mulut yang pertama kali diidentifikasi pada tahun 1912 oleh Klinger dan pertama kali dikenal sebagai patogen periodontal saat ditemukan dalam jumlah yang tinggi pada lesi *localized juvenile periodontitis* (Mythireyi *et al.*, 2012). Bakteri ini pertama kali diberi nama bakteri *Actinomycetemcomitans*. Nama *Actinobacillus actinomycetemcomitans* diberikan oleh Topley dan Wilson. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lebih berkaitan dengan *Haemophilus* dari pada genus *Actinobacillus*. Itulah alasan mengapa nama *Actinobacillus* diganti dengan *Aggregatibacter*. Tahun 2006, Norskov-Lauritsen dan Kilian mengusulkan agar *Actinobacillus actinomycetemcomitans* diklasifikasi ulang sebagai *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Priyanka *et al.*, 2014). Umumnya pada rongga mulut, bakteri ini ditemukan pada plak gigi, poket periodontal, dan sulkus gingival (Kesic *et al.*, 2009)

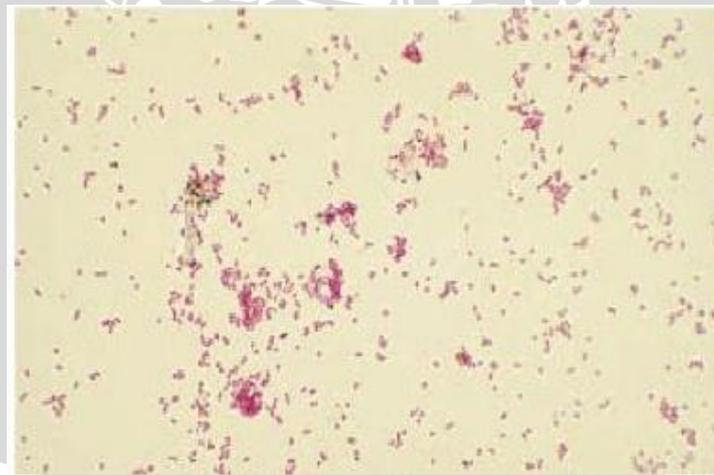
2.2.1 Taksonomi

Aggregatibacter actinomycetemcomitans adalah bakteri yang termasuk dalam klasifikasi sebagai berikut :

Tabel 2.1 Taksonomi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Domain	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gammaproteobacteria
Order	Parteurellales
Family	Pasteurellaceae
Genus	<i>Aggregatibacter</i>
Species	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>

(Nørskov-Lauritsen *et al*, 2006)



Gambar 2.2 Hasil pewarnaan Gram bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Mahon *et al.*, 2014).

2.2.2 Morfologi Bakteri

Aggregatibacter actinomycetemcomitans merupakan bakteri Gram negatif berbentuk kokobasil, dengan ukuran sekitar (0,7 x 1,0 µm), dapat tumbuh soliter atau berkoloni, tidak bergerak, bersifat fakultatif anaerob dan kapnofilik (Socransky *et al.*, 2006). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dapat hidup dengan baik dalam lingkungan anaerob dengan kadar CO₂ mencapai 5-10% dengan suhu optimal 37°C dan pH 7-8,5 (Graevenitz, 2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bersifat patogen oportunistik dan merupakan bagian flora normal yang berkolonisasi di mukosa rongga mulut, gigi dan orofaring (Forbes *et al.*, 2007).

2.2.3 Reaksi Biokimia

Aggregatibacter actinomycetemcomitans menunjukkan hasil positif pada uji katalase, oksidase dan asam dihasilkan dari glukosa, fruktosa, maltosa dan manosa. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tidak memfermentasi arabinosa, selobiosa, galaktosa, laktosa, melibiosa, melezitosa, trehalosa, rafinosa, salisin, sorbitol dan sukrosa. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* negatif untuk tes urease, ONPG hidrolisis, dan indol (Public Health England, 2014).

2.2.4 Faktor Virulensi

Sejumlah faktor virulensi dari bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang paling penting adalah leukotoksin. Faktor virulensi selain itu adalah lipopolisakarida, kolagenase, bakteriosin, faktor penghambat kemotaksis, faktor sitotoksik, protein pengikat Fc (*fragment crystallizable*), faktor

penghambat fibroblas, faktor immunosupresif serta faktor penghambat adhesif, invasi, dan fungsi dari leukosit PMN (Kesic *et al.*, 2009).

a. Leukotoksin

Leukotoksin pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* termasuk dalam kelompok RTX (*Repeat- in- Toxin*) yang sering ditemukan pada bakteri gram negatif dan memiliki peran signifikan dalam patogenesis penyakit periodontal. Leukotoksin dengan konsentrasi yang rendah akan mengakibatkan kematian sel secara apoptosis (Sriraman *et al.*, 2014).

b. Bakteriosin

Merupakan salah satu protein yang dihasilkan oleh bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Bakteriosin bekerja dengan meningkatkan permeabilitas membran sel target sehingga dapat ditembus oleh bakteri (Sriraman *et al.*, 2014). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memiliki bakteriosin spesifik yang disebut *Actinomycetemcomitin* (Mythireyi dan Krishnababa, 2012).

c. Kolagenase

Aktivitas kolagenase sering terlihat pada bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan *Porphyromonas gingivalis*. Kolagenase dapat menyebabkan berkurangnya densitas kolagen dan gangguan pada jaringan ikat periodontal (Sriraman *et al.*, 2014). Densitas kolagen merupakan gambaran klinis dari periodontitis (Sriraman *et al.*, 2014)

d. Sitotoksin

Cdt menunjukkan penghambatan proliferasi sel hospes dengan menyebabkan apoptosis dan penghentian siklus sel. Cdt menghasilkan tiga

operon gen berupa *cdtA*, *cdtB*, dan *cdtC* yang sering ditemukan pada bakteri gram negatif. *CdtB* merupakan komponen aktif yang berfungsi untuk memasuki DNA sel hospes dan mendegradasi kromosom sehingga menyebabkan penghentian siklus sel dan kerusakan DNA itu sendiri. *CdtA* dan *cdtC* berfungsi sebagai fasilitator supaya *cdtB* dapat memasuki DNA sel hospes. Dikaitkan dengan periodontitis agresif, *cdt* berperan dalam mengganggu perbaikan barrier epitel dan *remodeling* jaringan ikat periodontal (Mythireyi dan Krishnababa, 2012).

e. Faktor immunosupresif

Aggregatibacter actinomycetemcomitans menghasilkan faktor immunosupresif yang mempengaruhi regulasi sel limfosit B dan T. Faktor tersebut merupakan protein yang dapat menghambat DNA, RNA, dan protein sel T yang diaktivasi oleh mitogen atau antigen (Sriraman *et al.*, 2014).

f. Lipopolisakarida

Lipopolisakarida dari *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mengandung 30% karbohidrat, 30% lipid A, 10-12% *hexosamine*, 3-10% fosfat dan heptosa. Lipopolisakarida berperan dalam menghambat kolagen dan sintesis DNA serta menstimulasi resorpsi tulang. Lipopolisakarida menstimulasi makrofag untuk menghasilkan interleukin-1 α , interleukin-1 β , *tumor necrosis factor* (TNF), mRNA dan protein yang terlibat dalam inflamasi jaringan dan resorpsi tulang (Sriraman *et al.*, 2014).

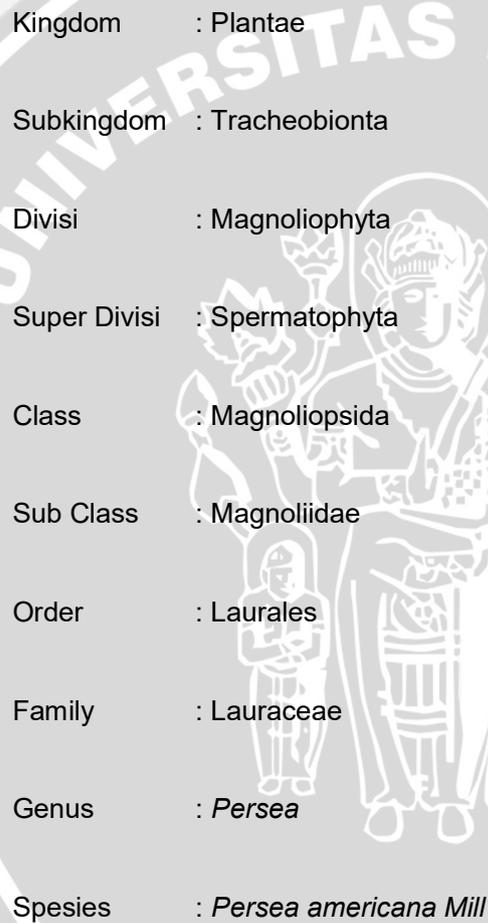
g. Penghambat Fungsi Neutrofil

Aggregatibacter actinomycetemcomitans mensekresi senyawa dengan berat molekul rendah yang menghambat kemotaksis leukosit PMN. Bakteri ini

dapat menghambat neutrofil dalam memproduksi agen antibakteri dengan menghasilkan protein yang menghambat produksi hidrogen peroksida oleh leukosit (Sriraman *et al.*, 2014)

2.3 Alpukat (*Persea americana Mill*)

2.3.1 Klasifikasi



Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Divisi	: Magnoliophyta
Super Divisi	: Spermatophyta
Class	: Magnoliopsida
Sub Class	: Magnoliidae
Order	: Laurales
Family	: Lauraceae
Genus	: <i>Persea</i>
Spesies	: <i>Persea americana Mill</i>

(Rukmana, 1997)

2.3.2 Morfologi

Tanaman alpukat diperkirakan masuk ke Indonesia pada abad ke 18. Alpukat di Indonesia mempunyai nama daerah antara lain : alpuket atau alpukat (Jawa Barat), alpokat (Jawa Tengah dan Jawa Timur), apokat dan jambu wolanda (Sunda). Tanaman ini berbentuk pohon, dengan ketinggian pohon dapat mencapai 3–10 m. Daun banyak menumpuk di ujung ranting, daunnya tumbuh tunggal berbentuk oval sampai lonjong dengan tepi rata atau berombak, panjang 10-20 cm, lebar 3 cm, letak daun agak tegak, dan permukaannya licin sampai agak kasar. Bunga tersusun malai, berwarna putih kekuningan. Buahnya bertipe buni, memiliki kulit lembut tak rata berwarna hijau tua hingga ungu kecoklatan, tergantung pada varietasnya. Daging buah alpukat berwarna hijau muda dekat kulit dan kuning dekat biji, dengan tekstur lembut. Berbiji satu berbentuk bola berwarna coklat (Rukmana, 1997).

2.3.3 Manfaat Biji Alpukat

Tanaman alpukat (*Persea americana Mill*) merupakan salah satu tanaman yang memiliki manfaat sebagai obat tradisional. Hampir semua bagian dari tanaman ini memiliki khasiat sebagai sumber obat-obatan. Bagian buah famili *Lauraceae* ini memiliki kandungan gizi yang tinggi, bagian daun digunakan untuk ramuan obat penyakit ginjal, hipertensi. Daun merupakan bagian tanaman alpukat yang memiliki manfaat sebagai obat tradisional. Berdasarkan penelitian, daun *Persea americana Mill* memiliki aktifitas antioksidan dan membantu dalam mencegah atau memperlambat kemajuan berbagai oksidatif stres yang berhubungan dengan penyakit (Owolabi *et al.*, 2010).

Biji alpukat diketahui memiliki efek hipoglikemik dan dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati sakit gigi, maag kronis, hipertensi dan diabetes melitus (Monica, 2006). Senyawa fenol dan tanin yang terdapat pada ekstrak biji alpukat dapat berinteraksi dengan komponen di dinding sel bakteri sehingga pembentukan bakteri terhambat (Kim *et al.*, 1995). *Tanin* diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel (Ajizah, 2004).

2.3.4 Kandungan Biji Alpukat

Hasil skrining fitokimia yang dilakukan oleh Zuhrotun (2007) terhadap simplisia dan ekstrak etanol biji alpukat menunjukkan bahwa biji alpukat mengandung polifenol, flavonoid, triterpenoid, alkaloid, saponin dan tanin (Zuhrotun, 2007). Biji alpukat juga dilaporkan mengandung 12,67% air, 2,78% abu dan 0,54% mineral serta mengandung campuran komponen polifenolik seperti katekin dan epikatin (Atsuhendra, *et al.*, 2007).

2.3.4.1 Polifenol

Polifenol adalah kelompok zat kimia yang ditemukan pada tumbuhan. Zat ini memiliki tanda khas yakni memiliki banyak gugus fenol dalam molekulnya. Polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada suatu pelarut yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada senyawa tersebut yang dimiliki berbeda jumlah dan posisinya. Turunan polifenol sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Polifenol merupakan komponen yang bertanggung

jawab terhadap aktivitas antioksidan dalam buah dan sayuran (Hattenschwiler dan Vitousek, 2000).

2.3.4.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan suatu komponen alam yang diketahui memiliki efek farmakologik seperti antioksidatif, antiinflamasi dan antidiuretik serta memiliki kemampuan sebagai zat antimikroba (Pepeljnjak *et al.*, 2005). Flavonoid memiliki aktivitas antimikroba dengan cara mendenaturasi dinding sel yang terdiri atas lipid dan asam amino (Arini, 2014). Denaturasi tersebut menyebabkan koagulasi protein dan terganggunya fungsi fisiologis bakteri sehingga akan mengakibatkan rusaknya sel bakteri secara permanen (Agustin, 2007). Golongan flavonoid maupun alkaloid tanaman dapat menyebabkan gangguan pada membran sel sehingga berakibat komponen penyusunan membran akan berubah dan proses fisiologi membran akan terganggu dengan terjadi kerusakan dan pengkerutan pada membran tersebut (Wurlina, 2006).

2.3.4.3 Triterpenoid

Triterpenoid merupakan suatu senyawa yang memiliki kerangka dasar yang terdiri dari enam unit satuan isoprene dan dalam biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik yaitu skualen. Triterpenoid merupakan golongan terbesar dari terpenoid dan tersebar luas dalam tumbuhan dan hewan. Di alam tritepen terdapat dalam bentukbebas, bentuk ester atau bentuk glikosidanya. Senyawa ini bekerja sebagai anti fungus, inseksida, anti pemangsa, antibakteri, dan anti virus (Lenny, 2006)

2.3.4.4 Saponin

Saponin adalah produk glikosida alam dengan berat molekul tinggi. Mekanisme saponin sebagai agen antibakteri adalah melalui interaksi dengan kolesterol pada membrane sel dan menyebabkan membrane seln mengalami modifikasi lipid yang akan mengganggu kemampuan bakteri untuk berinteraksi dengan membran yang sudah mengalami modifikasi tersebut. Terganggunya interaksi antara bakteri dengan membran selnya akan menyebabkan kemampuan bakteri untuk merusak atau berinteraksi dengan hospes akan terganggu. Hal tersebut menyebabkan zat antibakteri akan mudah masuk ke dalam sel dan akan mengganggu metabolisme sehingga terjadi kematian bakteri (Majidah *et al.*, 2014)

2.3.4.5 Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa kimiawi yang termasuk dalam golongan polifenol. Tanin diduga dapat mengikat salah satu protein yang dimiliki oleh bakteri yaitu adhesin. Hal tersebut akan merusak ketersediaan *reseptor* pada permukaan sel bakteri. Tanin telah dibuktikan dapat membentuk kompleks senyawa yang *irreversibel* dengan prolisin, suatu protein lengkap, dimana ikatan ini mempunyai efek penghambatan sintesis protein untuk membentuk dinding sel (Agnol *et al.*, 2003). Selain itu, tanin dapat merusak membran sel, mengerutkan dinding sel, sehingga mengganggu permeabilitas sel yang mengarah pada kematian (Ajizah, 2004).

2.3.4.6 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa amina tersier yang terdiri dari nitrogen primer, sekunder, dan quartener. Alkaloid biasanya bersifat basa dengan atom

nitrogen yang berupa cincin aromatic (Mustarichie dkk., 2011). Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah kemampuannya untuk masuk menembus dinding sel dan atau DNA bakteri (Cowan, 1999). Menurut Karou *et al.* (2005) senyawa alkaloid dapat menyebabkan lisis sel dan perubahan morfologi bakteri.

2.4 Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang mengganggu proses pertumbuhan bakteri. Antibakteri dibedakan menjadi dua berdasarkan cara kerjanya yaitu bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriostatik bekerja dengan menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan bakterisidal bekerja mematikan bakteri. Zat yang bersifat bakterisidal biasanya memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan yang bersifat bakteriostatik (Chomnawang *et al.*, 2005).

Bahan antibakteri yang baik adalah bahan yang efektif dalam membunuh kuman tapi tidak mengiritasi jaringan sekitarnya. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri disebut sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) dapat ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan dan endapan pada tabung yang berisi inokulum bakteri. Kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh 99,9% dari bakteri adalah Kadar Bunuh Minimal (KBM) (Forbes *et al.*, 2007).

Antibakteri dapat diperoleh secara alami, semisintetis, atau sintetik. Antibakteri alamiah adalah bahan metabolit yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme lain, atau biasa disebut antibiotika. Antibiotika tersebar di alam bebas dan memegang peranan penting dalam mengatur populasi mikroba di alam bebas (Brooks *et al.*, 2007).

Secara umum, sebaiknya bahan antibakteri mempunyai sifat-sifat sebagai berikut (Brooks *et al.*, 2007):

- a. Menghambat atau membunuh patogen tanpa merusak hospes;
- b. Bersifat bakterisidal dan tidak bakteriostatik;
- c. Tidak menyebabkan resistensi pada bakteri;
- d. Berspektrum luas;
- e. Tidak bersifat alergenik atau tidak menimbulkan efek samping bila digunakan dalam jangka waktu yg lama;
- f. Tetap aktif dalam plasma, cairan tubuh atau eksudat;
- g. Larut di dalam air dan stabil;
- h. Kadar bakterisidal di dalam tubuh cepat tercapai dan bertahan lama.

Selain itu, faktor-faktor yang mempengaruhi kematian bakteri pada pemberian suatu antibakteri adalah sebagai berikut (Brooks *et al.*, 2007):

- a. Jumlah bakteri
Makin banyak jumlah bakteri, makin lama waktu yang diperlukan untuk membunuh bakteri.
- b. Bentuk kehidupan bakteri.
Bentuk endospora sulit dibunuh dan bentuk vegetatif juga menunjukkan kepekaan yang bervariasi terhadap kontrol fisis maupun khemis.
- c. Lingkungan
Bahan organik, misalnya darah, pus, saliva, atau tinja sering menghambat kerja antimikroba khemis maupun fisis.

d. Waktu

Seperti diketahui, reaksi kimia akan berjalan lebih cepat pada suhu yang lebih tinggi. Oleh karena itu, proses pemanasan dengan suhu rendah akan memerlukan waktu lebih panjang untuk bakteri yang lebih resisten atau endospora.

2.4.1 Mekanisme Antibakteri

Mekanisme kerja antibakteri menurut Brooks *et al.*, (2007) antara lain :

a. Menghambat sintesis dinding sel bakteri

Dinding sel bakteri berfungsi sebagai pelindung substansi sel bakteri tersebut. Penghambatan dalam pembentukan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis sel.

b. Menghambat fungsi membran sel

Sitoplasma suatu sel dibatasi oleh suatu membran yang berperan sebagai barrier permeabilitas selektif, membran fungsi transport aktif, dan mengontrol komposisi internal sel. Fungsi membran sel terganggu akan menyebabkan komposisi internal sel tersebut keluar sehingga sel menjadi rusak dan kematian sel.

c. Menghambat sintesis protein

Suatu sel mengandung ribosom yang terdiri atas protein. Ribosom memiliki banyak tipe dengan komposisi dan fungsi yang berbeda. Apabila sintesis protein terganggu akan mempengaruhi fungsi ribosom.

- d. Menghambat sintesis asam nukleat
 - e. DNA atau RNA merupakan komponen yang paling penting didalam sel.
- Terganggunya sintesis asam nukleat akan secara langsung menghambat pertumbuhan bakteri.

2.4.2 Penentuan Aktivitas Antibakteri

Uji kepekaan antibakteri dapat dilakukan dengan metode penyebaran (*diffusion method*) dan metode pengenceran (*dilution method*).

2.4.2.1 Metode Difusi

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk mengukur aktivitas antibakteri. Menurut Kusmiyati dan Agustini (2006), metode difusi terdiri dari 3 cara :

A. Metode Difusi Sumuran

Metode ini dikerjakan dengan cara membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian. Lubang tersebut diisi dengan larutan yang akan diuji, kemudian diinkubasi. Pertumbuhan bakteri diamati pada daerah sekeliling lubang sumuran.

B. Metode Difusi Silinder

Metode silinder dilakukan dengan cara meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah

diinokulasi dengan bakteri. Setiap silinder diletakkan sedemikian rupa sehingga berdiri diatas media agar, kemudian diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, diameter area hambatan di sekeliling silinder diukur sebagai daya hambat terhadap uji bakteri.

C. Metode Difusi Cakram Kertas

Metode difusi cakram kertas sering disebut juga sebagai uji *Kirby-Bauer*. Tes ini dikerjakan dengan menggunakan cakram kertas saring yang mengandung bahan antimikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram yang telah diberi bakteri uji diletakkan di atas media padat. Setelah diinkubasi, diameter area hambatan di sekeliling cakram dihitung sebagai daya hambat terhadap uji bakteri.

2.4.2.2 Metode Dilusi

A. Metode Dilusi Tabung

Prinsip metode dilusi adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian, masing-masing tabung diisi dengan bahan yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya, seri tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Kadar Hambat Minimal (KHM) dilihat dari konsentrasi minimal bahan uji yang mampu menghambat pertumbuhan koloni yang tampak pada *broth* dilihat dari kekeruhannya. Biakan dari seluruh tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat dan diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Kadar

Bunuh Minimal (KBM) dilihat dari tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada biakan padat dengan konsentrasi terendah bahan uji (Dzen *dkk.*, 2003).

B. Metode Dilusi Agar

Metode dilusi agar dapat digunakan untuk mengukur Kadar Hambat Minimal (KHM) namun tidak dapat mengukur Kadar Bunuh Minimal (KBM). Metode ini dimanfaatkan media padat berupa agar yang diletakkan pada cawan petri, kemudian ditambahkan bahan uji antibakteri lalu dibiarkan mengeras dan disimpan di dalam kulkas dengan suhu 5°C sampai siap dipakai. Inoculum bakteri diteteskan pada agar pada hari dilakukannya perlakuan, sekitar 0,0001 ml dengan menggunakan pipet. Cawan petri selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam, kemudian dapat dilihat terdapat pertumbuhan bakteri atau tidak (Baron *et al.*, 1994).

2.7 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Ekstrak kering harus mudah digerus menjadi serbuk. Cairan penyari dapat berupa air, etanol, dan campuran air-etanol (Depkes RI, 1979).

Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Diketuhiunya senyawa aktif yang dikandung oleh simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah diserap oleh

pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu diserbuk sampai halus.

Simplisia yang keras seperti biji, kulit kayu dan kulit akar susah diserap oleh

pelarut, karena itu perlu diserbuk sampai halus (Ditjen POM, 2000).

