

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *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*. Umumnya pada rongga mulut bakteri ini ditemukan pada plak gigi, poket periodontal, dan sulkus gingiva (Kesic *et al.*, 2009; Mythireyi dan Krishnababa, 2012).

2.1.1 Klasifikasi Bakteri

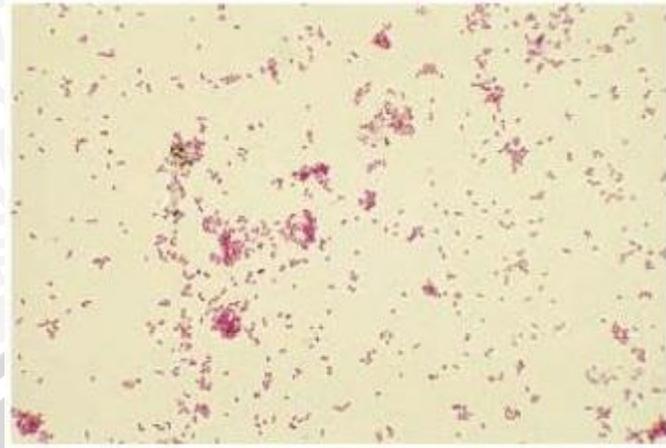
Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Pasteurellales
Famili	: Pasteurellaceae
Genus	: <i>Aggregatibacter</i>
Spesies	: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>

(Nørskov-Lauritsen dan Kilian, 2006)

2.1.2 Morfologi dan Sifat Pertumbuhan

Aggregatibacter actinomycetemcomitans termasuk dalam bakteri Gram negatif anaerob fakultatif berbentuk *coccobacillus*, caphnophilic, tidak membentuk spora, bersifat non-motiledan memiliki fimbria. Ukuran rata-rata bakteri ini 0,4-1,0 μm . Untuk dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* membutuhkan lingkungan anaerob yang diperkaya dengan CO_2 5-10%, suhu optimal 37°C, pH optimal 7-8,5 dan dapat distimulasi oleh reagen yang memiliki berat molekul rendah dalam jumlah kecil seperti hormon steroid. Apabila baru diisolasi pada media agar, bakteri ini akan membentuk koloni kecil (\varnothing 1-2 mm) yang tampak berkerut atau kasar, dan berbentuk seperti bintang pada bagian tengahnya (Kesic *et al.*, 2009; Kler dan Malik, 2010; Mythireyi dan Krishnababa, 2012).

Pertumbuhan koloni yang baik terbentuk setelah masa inkubasi 24 sampai 48 jam. Bakteri yang baru diisolasi memiliki kemampuan melekat yang kuat pada mediumnya. Hal ini disebabkan oleh adanya fimbria pada permukaan sel bakteri (Mythireyi dan Krishnababa, 2012). Dalam uji laboratorium, bakteri ini menghasilkan koloni kecil dan lengket yang sulit dilepaskan dari permukaan *plate* agar. Koloni bakteri ini *anhemoliticus*, halus, agak transparan terhadap cahaya, dan memiliki tepi tidak beraturan. Pada tes urease dan indol dihasilkan hasil positif, begitu juga dengan reduksi nitrat. Bakteri ini termasuk pada *biochemical active bacteria* karena memproduksi katalase dan dapat memfermentasi karbohidrat. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biasanya ditemukan pada plak gigi, poket periodontal, dan sulkus gingiva serta seringkali disebut sebagai salah satu penyebab periodontitis agresif (Kesic *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 Hasil pewarnaan Gram bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Mahon et al., 2014).

2.1.3 Faktor Virulensi

Aggregatibacter actinomycetemcomitans pertama kali dikenal sebagai patogen periodontal saat terdeteksi peningkatan jumlahnya pada lesi dari *localized juvenile periodontitis* (Mythireyi dan Krishnababa, 2012). Infeksi yang ditimbulkan akibat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* disebabkan adanya interaksi faktor-faktor virulensi. Bakteri ini dapat memproduksi beberapa faktor virulensi yang bertindak secara lokal dalam sulkus dan mengakibatkan kerusakan jaringan (Kler dan Malik, 2010). Faktor virulensi dari bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang paling utama adalah leukotoksin, kemudian terdapat pula lipopolisakarida kolagenase (endotoksin), bakteriosin, faktor penghambat kemotaksis, faktor sitotoksik, protein pengikat Fc (*Fragment crystallizable*), faktor penghambat fibroblast, faktor immunosupresif, serta faktor penghambat adhesif, invasi, dan fungsi dari leukosit PMN (Kesic et al., 2009).

a. Leukotoksin (LtxA)

Leukotoksin pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* termasuk dalam kelompok RTX (*Repeat-in-Toxin*) yang seringkali ditemukan pada bakteri

gram negatif dan memiliki peran signifikan dalam patogenesis penyakit periodontal. Leukotoksin banyak ditemukan di membran luar sel, pada vesikel ekstraselular membran luar sel. Mekanisme leukotoksisitas meliputi: aktivitas membranolitik yang membentuk pori pada sel target, fosfolipid sebagai reseptor toksin yang mengakibatkan masuknya Ca^{2+} dengan cepat ke dalam sel, serta nekrosis dan apoptosis (Kler dan Malik, 2010).

Sel target dari leukotoksin tersebut antara lain leukosit polimorfonuklear, monosit, dan makrofag. Sedangkan fibroblas, *human platelet*, serta sel endotel dan sel epitel resisten terhadap efek LtxA. Leukotoksin membentuk pori pada membran sel target yang mengakibatkan masuknya air dan *osmotic lysis* sel tersebut. Hal ini terjadi jika terdapat konsentrasi leukotoksin yang tinggi. Pada konsentrasi yang rendah, leukotoksin mengakibatkan kematian sel secara apoptosis (Sriraman *et al.*, 2014).

b. Bakteriosin

Bakteriosin merupakan salah satu protein yang dihasilkan oleh bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Protein ini bisa jadi mematikan bagi strain atau spesies bakteri lainnya serta berhubungan dengan permukaan sel dan vesikel ekstraselular bakteri. Bakteriosin bekerja dengan meningkatkan permeabilitas membran sel (Sriraman *et al.*, 2014).

c. Kolagenase

Aktivitas kolagenase sering terlihat pada bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan *Porphyromonas gingivalis*. Kolagenase dapat

menyebabkan berkurangnya densitas kolagen, yang sering terjadi pada penyakit periodontal (Sriraman *et al.*, 2014).

d. Sitotoksin

Aggregatibacter actinomycetemcomitans menghasilkan *heat-labile* sitotoksin yang menunjukkan virulensi sebagai akibat dari aktivitas fibroblas. Kebanyakan strain *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menghasilkan 115 kDa protein *heat-labile* yang secara spesifik menyebabkan lisis pada leukosit PMN dan makrofag (Sriraman *et al.*, 2014).

e. Faktor Imunosupresif

Aggregatibacter actinomycetemcomitans menghasilkan faktor imunosupresif 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 dapat menghambat sintesis kolagen dan DNA juga menstimulasi resorpsi tulang serta memproduksi interleukin-1 (IL-1) dan prostaglandin (PGE₂) dari makrofag. Hal ini berperan penting dalam perkembangan penyakit periodontal (Kler dan Malik, 2010; Sriraman *et al.*, 2014).

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. Lipopolisakarida ini sitotoksik pada

fibroblas, dan merupakan inhibitor kuat dari proliferasi fibroblas (Sriraman *et al.*, 2014).

g. Protein Pengikat Fc (*Fragment crystallizable*)

Antibodi regio Fc penting dalam mengikat anibodi ke reseptor spesifik pada leukosit PMN. Protein yang bersaing untuk regio ini menghambat pengikatan antibodi sehingga fagositosis juga terhambat. Molekul Fc yang dibiotinilasi dapat menghambat pengikatan molekul Fc terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Aktivasi komplemen juga dihambat (Sriraman *et al.*, 2014).

h. 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 hydrogen peroksida oleh leukosit. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* juga resisten terhadap defensin (peptida kation yang ditemukan di neutrofil) (Sriraman *et al.*, 2014).

2.2 *Apium graveolens* L.

2.2.1 Taksonomi *Apium graveolens* L.

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Sub kelas : Rosidae

Ordo : Apiales

Famili : Apiaceae

Genus : *Apium*

Spesies : *Apium graveolens* L.

(Peter, 2006)

2.2.2 Morfologi dan Karakteristik *Apium graveolens* L.

Seledri (*Apium graveolens* L.) adalah salah satu jenis tumbuhan obat yang biasa digunakan sebagai pelengkap masakan. Beberapa negara termasuk Jepang, Cina, dan Korea mempergunakan bagian tangkai dan daun sebagai bahan makanan. Penggunaan tanaman seledri paling lengkap adalah di Eropa, di sana bagian daun, tangkai, maupun umbinya banyak dimanfaatkan. Di Indonesia, tumbuhan ini diperkenalkan oleh penjajah Belanda dan digunakan daunnya untuk pelengkap sup atau penyedap masakan. Seledri dapat tumbuh baik di dataran rendah maupun tinggi dan paling baik pada kisaran suhu 7-16°C. Tanah yang baik untuk areal penanamannya adalah yang subur dan gembur dengan pH 5,5-6,8 (Dewi *et al.*, 2010).

Seledri (*Apium graveolens* L.) merupakan tanaman berbentuk semak atau rumput. Susunan tubuh tanaman seledri terdiri atas daun, tangkai daun, batang, dan akar. Daun seledri bersifat majemuk, menyirip ganjil dengan anak daun 3-7 helai. Tepi daun pada umumnya beringgit dengan pangkal atau ujung yang runcing. Tulang-tulang daunnya menyirip dengan ukuran panjang 2-7,5 cm dan lebarnya 2-5 cm. Tangkai daun tumbuh tegak ke atas atau ke pinggir batang, panjangnya sekitar 5 cm, berwarna hijau atau hijau pucat. Batang seledri amat pendek, sehingga seolah-olah tidak terlihat. Sistem perakaran menyebar ke semua arah sampai kedalaman 30-40 cm. Bunganya majemuk, berbentuk payung dengan tangkai 2 cm, berwarna hijau dengan 5 benang sari. Buahnya berbentuk kotak mengerucut sepanjang 1-1,5 mm dan berwarna hijau kekuningan (Wirantika, 2000).



Gambar 2.2 *Apium graveolens* L. (Tyagi *et al.*, 2013).

2.2.3 Komponen Antimikroba Daun Seledri

Daun seledri mengandung flavonoid, saponin, dan tanin yang telah diketahui memiliki sifat antibakteri (Majidah *et al.*, 2014). Daun dan batang seledri telah diketahui banyak mengandung senyawa fenol, dengan flavonoid yang merupakan komponen utama pada daun seledri dengan jumlah mencapai 202

mg/kg (Kooti, 2014). Selain itu daun seledri memiliki kandungan tanin sebesar 3,89-4,39 mg/100g dan keseluruhan kandungan senyawa fenolnya (termasuk flavonoid, saponin, tanin, *phenolic acids*, terpenoid, steroid, dan *volatile oils*) mencapai 177,23 mg/100g (Shad *et al.*, 2011; Al-Snafi, 2014).

2.2.3.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polar yang umumnya mudah larut dalam bahan pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dan lain-lain. Flavonoid termasuk golongan terbesar dari senyawa fenol yang ditemukan di alam. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 karbon, dimana dua cincin benzene (C_6) terikat pada rantai propan (C_3) sehingga membentuk suatu susunan $C_6-C_3-C_6$ (Bechtold dan Mussak, 2009).

Flavonoid mempunyai khasiat memperbaiki kerapuhan pembuluh darah kapiler serta mencegah pendarahan pembuluh darah kapiler, antifungi, dan sitotoksik serta bermanfaat sebagai antiinflamasi, antioksidan, antikanker, dan antimikroba. Beberapa aktivitas antibakteri dari senyawa flavonoid antara lain dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi bakteri (Chusnie dan Lamb, 2005). Flavonoid juga memiliki kemampuan untuk membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan dapat terlarut dalam dinding sel sehingga mampu merusak membran sel bakteri (Khunaifi, 2010). Senyawa flavonoid dapat mendenaturasi protein sel bakteri dan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri (Nuria *et al.*, 2009).

2.2.3.2 Saponin

Saponin merupakan senyawa glikosida kompleks dengan berat molekul tinggi yang banyak dihasilkan tanaman. Saponin memiliki sifat sebagai agen aktif permukaan (*surface-active properties*), yaitu menurunkan tegangan permukaan dan bereaksi dengan membran plasma dan kemungkinan dapat masuk ke membran lipid bilayer, berkaitan dengan kolesterol dan membentuk *cholesterol-saponin complex* yang pada akhirnya dapat mengakibatkan lisis sel. Pada bakteri gram negatif dimana membran luarnya ditutupi oleh lipopolisakarida, saponin juga dapat mengganggu permeabilitas membran luar bakteri melalui reaksinya dengan lipid A yang terkandung pada lipopolisakarida dan meningkatkan permeabilitas membran sel (Arabski, 2012).

2.2.3.3 Tanin

Tanin merupakan salah satu jenis senyawa yang termasuk ke dalam golongan polifenol. Senyawa ini banyak dijumpai pada tumbuhan. Tanin memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme kerja tanin sebagai antimikroba berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktivasi adhesin sel mikroba yang terdapat pada permukaan sel. Tanin mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Ngajow *et al.*, 2013). Selain itu, senyawa tanin memiliki mekanisme kerja dengan mengerutkan dinding sel, sehingga senyawa tanin dapat dengan mudah masuk ke dalam sel bakteri dan mengkoagulasi protoplasma sel bakteri (Majidah *et al.*, 2014).

2.3 Metode Ekstraksi

Kandungan kimia dari suatu tanaman umumnya memiliki sifat kepolaran yang berbeda-beda, sehingga perlu dipisahkan secara selektif menjadi kelompok-kelompok tertentu. Prinsip dasar ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non-polar dalam pelarut non-polar. Serbuk simplisia diekstraksi berturut-turut dengan pelarut yang berbeda polaritasnya (Goeswin, 2007). Pemilihan jenis ekstraksi bergantung pada jenis senyawa yang diinginkan larut (Sarker *et al.*, 2006).

2.3.1 Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut dalam wadah pada suhu ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang digunakan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut. Dapat dilakukan pula pengadukan agar dapat mempercepat waktu ekstraksi (Sarker *et al.*, 2006).

Metode ini digunakan untuk mencari zat aktif yang mudah larut dalam larutan penyari, tidak mengembang dalam pelarut, serta tidak mengandung benzoin. Keuntungan dari metode ini adalah pengerjaannya yang sederhana (Mustofa, 2008). Kerugian dari metode maserasi antara lain waktu yang diperlukan cukup lama, cairan penyari yang digunakan lebih banyak, dan tidak

dapat digunakan untuk bahan-bahan yang memiliki tekstur keras seperti lilin dan benzoin. Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi yaitu bahan dihaluskan dengan cara dipotong-potong atau dibuat serbuk, kemudian disatukan dengan bahan pengekstraksi. Waktu lamanya maserasi berbeda-beda, mulai dari beberapa jam atau bahkan ada yang menghabiskan waktu sampai beberapa minggu. Metode ini tidak menggunakan pemanasan, sehingga zat aktif yang terkandung dalam bahan tidak rusak (Sarker *et al.*, 2006).

2.3.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan proses ekstraksi dengan mengalirkan penyari melalui bahan yang telah dibasahi. Keuntungan dari metode ini adalah tidak diperlukannya proses pemisahan ekstrak dengan sampel, sedangkan kerugiannya adalah apabila material yang diekstraksi tidak terdistribusi secara homogen pada wadahnya, pelarut tidak dapat mencapai seluruh area material tersebut dan ekstraksi bisa gagal, dan biasanya suhu pelarut menjadi dingin selama proses ekstraksi sehingga tidak melarutkan komponen secara efisien (Sarker *et al.*, 2006; Irawan, 2010).

2.3.3 Sokletasi

Sokletasi merupakan proses ekstraksi yang menggunakan penyarian berulang dan pemanasan. Penggunaan metode sokletasi adalah dengan cara memanaskan pelarut hingga membentuk uap dan membasahi sampel. Pelarut yang sudah membasahi sampel kemudian akan turun menuju labu pemanasan dan kembali menjadi uap untuk membasahi sampel, sehingga penggunaan pelarut pada ekstraksi ini lebih sedikit karena terjadi sirkulasi pelarut yang selalu membasahi sampel. Meskipun waktu ekstraksinya lebih singkat, proses ini

kurang baik untuk senyawa yang dapat rusak oleh panas (Sarker *et al.*, 2006; Irawan, 2010).

2.3.4 Destilasi uap

Destilasi uap merupakan suatu metode pemisahan bahan kimia berdasarkan perbedaan kecepatan dan kemudahan menguap (volatilitas) bahan. Proses destilasi uap lebih banyak digunakan untuk senyawa organik yang tahan terhadap suhu tinggi, yang lebih tinggi dari titik didih pelarut yang digunakan. Pada umumnya metode ini digunakan untuk ekstraksi minyak-minyak menguap (*essential*) dari sampel tanaman atau komponen kimia lain yang mempunyai titik didih tinggi pada tekanan udara normal (Irawan, 2010).

2.4 Uji Kepekaan Bakteri terhadap Antimikroba

Sebelum zat antimikroba digunakan untuk keperluan pengobatan, maka perlu diuji terlebih dahulu efeknya terhadap spesies bakteri tertentu (Dzen *et al.*, 2003). Uji kepekaan bakteri terhadap antimikroba dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya adalah:

2.4.1 Metode Dilusi

a. Dilusi Tabung

Metode dilusi tabung digunakan untuk menentukan konsentrasi minimal suatu bahan antimikroba dalam menghambat atau membunuh mikroorganisme tertentu dari suatu ekstrak. Prinsip dari metode ini ialah dengan menggunakan suatu seri tabung reaksi dan sejumlah bakteri uji, kemudian masing-masing tabung diisi dengan bahan uji yang diinginkan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian diamati kekeruhan pada tabung. Kadar Hambat

Minimal (KHM) dilihat dari konsentrasi minimal bahan uji yang mampu menghambat pertumbuhan koloni yang tampak pada media *broth* secara nyata. Biakan dari seluruh tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat lalu diinkubasikan dan keesokan harinya 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. Dilusi Agar

Metode dilusi agar dapat digunakan untuk mengukur Kadar Hambat Minimal (KHM), namun tidak dapat mengukur Kadar Bunuh Minimal (KBM). Metode ini memanfaatkan media padat berupa agar yang diletakkan pada cawan petri dan ditambahkan bahan uji antimikroba. Inokulum bakteri diteteskan pada hari dilakukannya perlakuan dengan menggunakan pipet. Selanjutnya dilakukan inkubasi cawan petri pada suhu 37°C dan dilihat terdapat pertumbuhan koloni bakteri atau tidak. Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Baron *et al.*, 1994; Dougherty dan Pucci, 2012).

2.4.2 Metode Difusi

a. Difusi Cakram

Metode difusi cakram, yang sering disebut sebagai uji Kirby-Bauer, menyediakan ukuran kualitatif dari kemampuan sebuah antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Pada metode ini, suatu cakram kertas yang telah diberi larutan antimikroba ditempatkan pada cawan berisi media agar yang

telah ditanam bakteri uji. Bakteri kemudian dibiarkan tumbuh di bawah kondisi yang benar-benar terkontrol sedangkan antimikroba berdifusi keluar cakram menuju agar. Selanjutnya diukur diameter zona hambatan pertumbuhan dan dicatat dengan satuan millimeter. Ukuran zona hambatan tergantung pada konsentrasi cakram antimikroba dan karakteristik difusi obat melewati agar (Chamidah, 2012).

b. Difusi Sumuran

Metode difusi sumuran memiliki keunggulan lebih mudah dan praktis digunakan. Pembacaan hasil juga mudah dilakukan. Metode ini dilakukan dengan cara membuat lubang sumuran pada *petri dish* yang sudah terisi media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Kemudian lubang sumuran tersebut diisi dengan larutan yang akan diuji. Hasil penelitian berupa zona hambat yakni daerah jernih di sekeliling lubang sumuran (Chamidah, 2012).