

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Periodontitis

2.1.1 Definisi

Periodontitis merupakan penyakit peradangan jaringan periodontal yang disebabkan terutama oleh bakteri spesifik yang terletak pada subgingiva. Dampak yang ditimbulkan selain hal tersebut yaitu respon inflamasi gingiva, lalu berlanjut ke struktur jaringan penyangga gigi yaitu sementum, ligamentum periodontal dan tulang alveolar. Keadaan ini mengakibatkan terjadinya hilang perlekatan pada gingiva. Periodontitis juga menyebabkan terjadinya kerusakan tulang alveolar lebih dalam, migrasi patologis yang menimbulkan diastema, pembentukan poket periodontal dan kegoyangan gigi yang dapat mengakibatkan tanggalnya gigi geligi (Newman, *et al.*, 2015).

2.1.2 Etiologi

Beberapa hal mampu menjadi penyebab periodontitis diantaranya disebabkan oleh faktor sistemik, lokal, genetic ataupun factor lingkungan. Salah satu faktor lokal yang memicu periodontitis adalah plak. Plak banyak mengandung bakteri. Bakteri yang memiliki keterlibatan dalam periodontitis adalah bakteri subgingiva meliputi bakteri obligat anaerob gram negatif seperti *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, dan *Porphyromonas gingivalis* (Reddy,2014).

Gejala pada periodontitis salah satunya terjadi peradangan. Tanda-tanda klinis dari peradangan yaitu perdarahan saat probing, perubahan warna, kontur, dan

konsistensi. Periodontitis juga dapat diperparah dengan adanya factor usia, jenis kelamin, kebiasaan merokok, penyakit sistemik (DM), hormonal dan genetik (Reddy, 2014).

2.1.3 Patogenesis Periodontitis

Periodontitis diawali dengan pembentukan plak dimana bakteri patogen hidup bersama dan berinteraksi dalam suatu lingkungan yang tertutup matriks. Plak biofilm menginduksi adanya paparan dari hospes terhadap komponen permukaan sel bakteri seperti lipopolisakarida yang dilepaskan kedalam sulkus gingiva dalam bentuk vesikel-vesikel. Produk dari bakteri ini akan menyerang dan masuk kedalam jaringan yang menyebabkan terjadinya kontak antara bakteri dengan berbagai sel hospes termasuk monosit dan makrofag. Periodontitis ditandai dengan adanya pembentukan kantong-kantong (poket), bersama-sama dengan terjadinya perusakan serabut-serabut ligamen periodontal yang mengikat gigi pada tulang alveolar (Newman, *et al.*, 2015).

Pada penyakit periodontal enzim bakteri memiliki kontribusi didalam proses terjadinya penyakit termasuk pembentukan asam fosfat, gelatinase, phospholipase, kolagenase, hyaluroidase, aminopeptidase, dan alkaline. Penghancuran periodontal tissue kolagen akan mengalami degradasi. Bakteri periodontal yang ditemukan memproduksi kolagen adalah Porphyromonas gingivalis dan Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Eley, 2010).

Pada periodontitis terjadi aktivitas enzim kolagenase dari netrofil dan fibroblas yang menghancurkan fiber kolagen pada ligamen periodontal dan sel epitel bermigrasi ke apikal disepanjang permukaan akar. Sehingga menghasilkan poket yang memicu terjadinya peningkatan dari pertumbuhan patogen anaerob dan juga pertumbuhan plak subgingiva di dalam poket. Yang pada akhirnya akan

mengakibatkan terjadi kerusakan pada ligamen periodontal (Newman, *et al.*, 2015).

2.2 Periodontitis Kronis

Periodontitis kronis merupakan penyakit infeksi karena adanya proses inflamasi jaringan dari gigi yang secara progresif dapat menimbulkan kehilangan perlekatan atau attachment loss dan kehilangan tulang atau bone loss (Reddy, 2014). Gingivitis pada tingkat keparahan tertinggi kerap menjadi periodontitis kronis dengan ditandai adanya resesi gingiva, kehilangan tulang alveolar, dan adanya poket dengan ukuran 4-5mm. Perubahan dari kondisi rongga mulut yang sehat menjadi gingivitis dan kemudian menjadi periodontitis sulit diprediksi (Eley, 2010).



gambar 2.1 Radiografi yang menunjukkan kehilangan tulang berlanjut pada kasus periodontitis kronis (Sharpe, 2009).

Prevalensi tingkat keparahan dan perkembangan variabel kemungkinan karena pengaruh dari variasi faktor resiko. Bakteri plak menjadi kunci dari faktor etiologi. Periodontitis kronis banyak ditemukan pada orang dewasa, namun tahap awal dapat terjadi pada remaja (Clerehugh, 2011). Terdapat beberapa bakteri yang dapat memicu timbulnya periodontitis kronis salah satunya adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Reddy, 2014).

Perawatan pada periodontitis kronis dapat dengan :

1. Terapi awal , yaitu pre-treatment seperti mengontrol OH pasien, menghentikan kebiasaan merokok dari pasien. Monitoring dapat dilakukan 8-12 minggu.
2. Terapi korektif, koreksi pada pemakaian alat-alat prostodonsi cekatan atau lepasan dapat dikontrol sesuai kebutuhan, termasuk lanjutan non- surgical periodontal terapi.
3. Terapi suportif terapi melakukan plak kontrol, pengontrolan kebiasaan merokok.



Gambar 2.2 Periodontitis kronis

Sumber : *Color Atlas of Common Oral Diseases* (Craig, et al., 2003)

2.3 Bakteri *porphyromonas gingivalis*

2.3.1 Klasifikasi

Menurut kusumawardani (2010), klasifikasi *Porphyromonas gingivalis* adalah
phylum : *bacterioidetes*, klas : *bacteroides*, ordo : *bacteroidales*, famili :
Porphyromonadaceae, genus : *Porphyromonas*, spesies : *Porphyromonas gingivalis*.



Gambar 2.3 *Porphyromonas gingivalis* (Nelson, 2003).

2.3.2 Morfologi

Porphyromonas gingivalis merupakan jenis bakteri yang tidak berspora, jenis dari gram negatif, anaerob, ukurannya mulai dari 0,5-0,8 hingga 1,0-1,5 μm tetapi terkadang dapat ditemukan yang lebih panjang 4-6 μm . Hal ini diperkirakan disebabkan oleh, adanya perubahan bentuk (Jaroslav, *et al.*, 2014). Bakteri ini berpigmen hitam kecoklatan dan tumbuh di media kultur membentuk koloni yang coccobacilli atau konveks, bersifat halus dan tampak mengkilat, memiliki diameter 1-2 mm. Penyebab dari warna gelap yang progresif pada pusatnya dikarenakan adanya produksi *prothème*. *Prothème* ini merupakan suatu substansi yang bertanggung jawab terhadap warna dari koloni (Kusumawardani, *et al.*, 2010).

2.3.3 Korelasi *Porphyromonas gingivalis* sebagai periodontopatogen utama pada periodontitis kronis

Bakteri ini banyak ditemukan dalam plak gigi di rongga mulut yang membuat keterlibatan didalam petogenesis periodontitis yang memberi dampak kehancuran jaringan penyangga gigi yang pada akhirnya beresiko pada kehilangan gigi (Newman, *et al.*, 2015).

Porphyromonas gingivalis memberikan efek perubahan patologik jaringan periodontal dengan aktivasi respons imun dan hilangnya inflamatori. Bakteri tersebut

memproduksi berbagai faktor virulensi yang bersifat patogenik diantaranya lipopolisakarida dan hydrogen sulfide, yang mampu menginduksi hospes untuk melepaskan IL-1 dan TNF- α (Kusumawardani, et al., 2010). Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* menginduksi sitokin proinflamasi, seperti IL-1 β , IL-6, dan IL-8, yang menyebabkan kerusakan jaringan periodontal (Kato, et al., 2014).

2.3.4 Metabolisme

Porphyromonas gingivalis membutuhkan hemin, hasil akhir metabolic darah sebagai sumber zat besi, serta pepida untuk pertumbuhan. Dilanjutkan dengan bakteri yang mengikat hemin pada permukaan sel dan menstansportasikan seluruh molekulnya ke dalam sel dimana dalam mekanisme tersebut membutuhkan sebuah energy. Dalam hal memenuhi kebutuhan tersebut bakteri menghasilkan tiga hemaglutinin yang bekerja dalam interaksi perlekatan dengan hospes dan lima proteinase yang berkontribusi untuk menginaktifkan molekul efektor pada respon imun juga dalam destruksi jaringan (Hajishengallis, 2011).

2.3.5 Mekanisme perlekatan *porphyromonas gingivalis* pada hospes

mekanisme perlekatan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dibantu berbagai faktor virulensi yang berhubungan dengan destruksi jaringan dan mekanisme pertahanan terhadap inang. Terdapat 4 mekanisme perlekatan bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Jaroslav, et al., 2014). Berikut mekanismenya :

a) Fimbriae

Sebagai perantara utama dalam perlekatan bakteri ke substrat yang tersedia, selain itu juga memiliki sifat kemotaktik dan induksi sitokin yang juga terlibat dalam pathogenesis. Fimbriae pada permukaan sel bakteri sering disebut sebagai hidrofobin yang bertugas terhadap interaksi bakteri dengan sel hospes. Bakteri yang

mempunyai protein dengan sifat hidrofob lebih mudah difagosit oleh sel-sel polimorfonuklear leukosit.

b) Protease

Terutama arginin-spesifik, yang disebut gingipain, mampu mendegradasi molekul inang seperti imunoglobulin, komplemen, protein sekuester hemin, hemolisin, kolagenase, dan protein jaringan ikat inang, serta berperan dalam jalur tidak langsung untuk menghancurkan dengan mendegradasi inhibitor yang dihasilkan sel inang untuk mengatur protease sel inang yang terlibat dalam inflamasi.

c) Hemagglutinin

Akan menginisiasi kolonisasi dengan cara memperantarai pengikatan bakteri dengan reseptor (biasanya oligosakarida) pada sel manusia, karena bakteri ini membutuhkan hemin untuk pertumbuhan, maka ikatannya dengan eritrosit sel tubuh manusia juga memberikan fungsi nutrisi. Hemagglutinin dan fimbriae mempunyai arti sebagai adhesin untuk perlekatan bakteri gram negatif pada sel hospes.

d) Kapsular polisakarida

Bekerja menghambat fagositosis oleh sel imun inang serta berperan penting dalam perlekatan sel. Untuk memudahkan bakteri berpenetrasi ke jaringan dan mengganggu aktivitas sel tubuh, maka bakteri menghasilkan produk akhir metabolik meliputi butir-butir dan propionat yang memiliki berat molekul rendah. Mekanisme perlawanan bakteri terhadap sel inang, yaitu dihasilkannya asam suksinat yang akan menghambat kemotaksis netrofil, dengan cara menurunkan pH intrasel pada netrofil serta menghambat pergerakan respon PMN terhadap peptide kemotaktik dengan cara mendepolarisasi membran PMN.

2.4 Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri suatu bahan dapat diukur untuk menentukan kemampuan suatu bahan untuk melawan bakteri, mendeteksi mekanisme resistensi bakteri, dan mengukur interaksi bahan dengan mikroorganisme. Penentuan aktivitas bahan antimikroba dapat dilakukan dengan dua metode (Forbes, 2007).

2.4.1 Metode Dilusi

2.4.1.1 Dilusi Tabung

Cara ini menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah sel bakteri tertentu yang akan diuji. Masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah Kadar Hambat Minimum (KHM) dari obat. Biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan, dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan pada yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri adalah Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari obat terhadap bakteri yang diuji. Menentukan KHM obat juga dilakukan dengan cara menggunakan medium agar padat yang disebut dengan metode *E test* (Jennifer, 2006).

2.4.1.2 Dilusi Agar

Metode dilusi agar dapat digunakan untuk mengukur Kadar Hambat minimum (KHM) namun tidak dapat mengukur Kadar Bunuh Minimum (KBM). Metode ini memanfaatkan 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. Inokulum bakteri diteteskan pada agar pada hari dilakukannya perlakuan sekitar 0,001 ml dengan menggunakan pipet. Selanjutnya dilakukan inkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 16-18 jam kemudian dapat dilihat terdapat pertumbuhan bakteri atau tidak (Jennifer, 2006).

2.4.2 Metode Difusi

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan kertas saring yang mengandung bahan antimikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram kemudian ditempatkan pada media padat yang telah diberi bakteri uji. Setelah diinkubasi, diameter area hambatan dihitung sebagai daya hambat obat terhadap bakteri uji. Area hambatan yang terbentuk ditunjukkan sebagai daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri disekitar cakram kertas saring (Brooks *et al.*, 2013).

Cara untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut apakah isolat mikroba sensitif atau resisten terhadap obat, dapat dilakukan dua cara (Brooks *et al.*, 2013), yaitu dengan :

- a. Cara Kirby Bauer, yaitu dengan membandingkan diameter area jernih (zona hambatan) di sekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh NCCLS (*National Commitee for Clinical Laboratory Standard*). Melalui tabel NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sedang, atau resisten.
- b. Cara Joan-Stokes, yaitu dengan membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Menggunakan cara ini, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji bersama-sama dalam satu piring agar.

2.5 Tanaman Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*)

2.5.1 Deskripsi Tanaman Kumis Kucing

Tanaman kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) merupakan salah satu tanaman obat yang sudah lama dikenal dan dimanfaatkan sebagai obat tradisional di dalam dan di luar negeri. Tanaman ini telah lama dikenal sebagai obat penyakit ginjal, arteriosclerosis, melancarkan pengeluaran air seni, radang kandung kemih, dan rematik (Keng *et al.*, 2006). Tanaman ini didistribusikan di seluruh Asia Tenggara dan Australia tropis. Tumbuhan ini terlihat mirip dengan *peppermint*, namun tanaman ini lebih kering, asin, dan rasanya pahit (Bakti Husada, 2001). Tanaman ini memiliki beberapa sinonim nama latin, antara lain *Orthosiphon stamineus* Benth., *O. grandiflorum* auct. Non Terrac., *O. spicatus* auct. non Benth. Ada tiga varietas tanaman kumis kucing, yaitu varietas berbunga ungu, berbunga ungu muda, dan berbunga putih. varietas berbunga putih (*Orthosiphon aristatus*) merupakan simplisia yang dianjurkan sebagai bahan baku, disamping itu varietas ini memiliki kandungan sinensetin yang lebih tinggi. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya, didapatkan kandungan sinensetin yang tertinggi dari tanaman berbunga putih.

Tanaman ini berjenis akar tunggang. Batangnya berbentuk persegi empat agak beralur dan berwarna hijau keunguan. Daun berbentuk bulat telur, lonjong, berwarna hijau, panjang kurang dari 10 cm dan lebarnya 3 – 5 cm. Posisi daun pada batang berhadapan dengan tulang daun bercabang-cabang. Apikal daunnya mengerucut dengan pangkal daun tajam (Keng *et al.*, 2006).

Tanaman kumis kucing dapat dibudidayakan mulai dataran rendah sampai ketinggian 1200 m di atas permukaan air laut, akan tetapi ketinggian di atas 700 m di atas permukaan laut dapat menghambat pertumbuhan tanaman tersebut. Bagian

tanaman yang sering digunakan sebagai obat adalah bagian herba (terutama daunnya), baik yang segar maupun yang telah dikeringkan (Hossain, *et al.*, 2010).



Gambar 2.4: Tanaman Kumis Kucing varietas berbunga putih

(Max, 2004).

2.5.2 Kandungan Daun Kumis Kucing

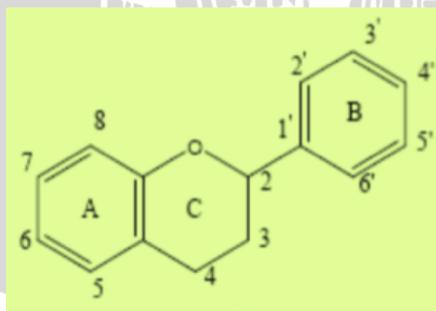
Daun tanaman kumis kucing mengandung mineral hingga 12% dengan garam kalium sebagai komponen terbanyaknya, juga mengandung kurang lebih 0.2% flavonoid lipofilik, termasuk di dalamnya sinensetin dan flavonol glikosida. Kandungan lainnya antara lain saponin, orthosiphon glikosida, myo-inositol dan kandungan minyak atsiri yang mencapai 0.7% (Leng, *et al.*, 2011).

Pada daun kumis kucing, kandungan myoinositol berperan sebagai metabolit seluler yang membentuk dasar struktural sel dari sejumlah molekul lipid dan sintesis asam askorbat (Murphy, *et al.*, 2008). Selanjutnya, kandungan orthosiphon glikosida berperan sebagai antioksidan pada tumbuhan (Ahamed, *et al.*, 2010). Kandungan minyak atsiri yang berperan sebagai antifungal pada tumbuhan (Hossain, *et al.*, 2011). Dilanjutkan kandungan garam kalium yang berperan dalam proses pembentukan pati, mengaktifkan enzim, membantu proses metabolisme sel dan menunjang perkembangan akar (Hafiz, *et al.*, 2012).

2.5.2.1 Flavonoid

Senyawa-senyawa flavonoid adalah senyawa organik bahan alam yang bersifat larut air (hidrofilik) dan merupakan senyawa polifenol yaitu senyawa fenolik yang memiliki lebih dari satu gugus hidroksil. Flavonoid mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon. Senyawa-senyawa flavonoid adalah senyawa 1,3 diaril propana, senyawa isoflavonoid adalah senyawa 1,2 diaril propana, sedangkan senyawa-senyawa neoflavonoid adalah 1,1 diaril propana (Lewis *et al.*, 2007).

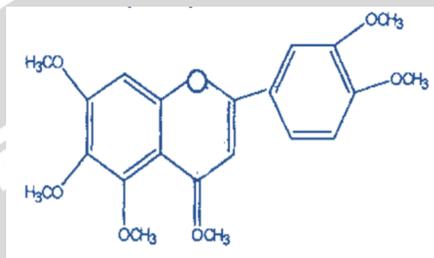
Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bersifat desinfektan yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang dapat menyebabkan aktivitas metabolisme sel bakteri berhenti karena semua aktivitas metabolisme sel bakteri dikatalis oleh suatu enzim yang merupakan protein. Berhentinya aktivitas metabolisme ini akan mengakibatkan kematian sel bakteri (Yuliana, *et al.*, 2010). Flavonoid mampu membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler sehingga mengganggu integritas membran sel bakteri (Omar, *et al.*, 2010). Flavonoid juga mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri (Rosilawati dkk., 2010).



Gambar 2.5: Struktur kimia dasar Flavonoid (Shimamura, 2006)

Turunan flavonoid dengan metilasi gugus hidroksil menghasilkan beberapa senyawa sebagai contoh senyawa sinensetin. Sinensetin merupakan senyawa hasil metabolisme sekunder. Senyawa yang disintesis makhluk hidup bukan untuk

memenuhi kebutuhan dasar, melainkan untuk kebutuhan sekunder yakni mempertahankan eksistensinya dalam berinteraksi dengan ekosistem. Keberadaan senyawa sinensetin dapat dijadikan sebagai petunjuk adanya daun kumis kucing dalam suatu campuran, karena sinensetin merupakan senyawa yang paling stabil. Sinensetin merupakan senyawa aglikon flavonoid yang bersifat semipolar (Yen, *et al.*, 2012)



Gambar 2.6: Struktur kimia sinensetin (Yoshiko, *et al.*, 2012).

2.5.2.2 Saponin

Saponin adalah senyawa aktif yang kuat dan menimbulkan busa jika digosok dalam air sehingga bersifat seperti sabun dan memiliki efek antibakteri. Saponin dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga dapat mengubah struktur dan fungsi membran, menyebabkan denaturasi protein membran sehingga membran sel akan rusak dan lisis (Madduluri, 2013). Saponin memiliki molekul yang hidrofilik dan molekul yang melarutkan lemak (lipofilik) sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel yang akhirnya menyebabkan kehancuran bakteri (Harborne, 2006).

2.5.3 Peran Daun Kumis Kucing Sebagai Antibakteri

Zat antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau metabolisme bakteri. Berdasarkan aktivitasnya zat antibakteri dibedakan menjadi dua jenis, yaitu yang memiliki aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan yang memiliki aktivitas bakterisidal (membunuh bakteri). Bakteriostatik memiliki kemampuan menghambat perkembangan bakteri. Perkembangbiakan akan berlangsung bila zat

antibakteri telah tiada. Bakteriosidik memiliki sifat mematikan bakteri, bakteri tidak dapat pulih lagi, dimana bakteri yang sudah dimatikan tidak dapat berkembangbiak meskipun tidak terkena zat antimikroba (Pratiwi, 2008)

Banyak penelitian yang mengamati peran flavonoid sebagai antimikroba. Mekanisme flavonoid, khususnya isoflavon sebagai antimikroba adalah dengan cara menurunkan kekentalan membran membran sel di dalam dan luar sehingga fungsi membran sitoplasma terganggu serta menghambat metabolisme energi yang mengakibatkan terganggunya sintesis DNA, RNA, protein, dan dinding sel. Semua mekanisme tersebut mengakibatkan matinya bakteri-bakteri patogen (Lewis, 2007).

2.5.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penarikan zat aktif yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut tertentu yang dipilih dengan tujuan zat yang diinginkan dapat larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh – tumbuhan atau hewan dikumpulkan, dibersihkan atau dicuci, dikeringkan dan dijadikan serbuk. Hasil dari ekstraksi disebut ekstrak. Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair dibuat dengan menyari *simplisia* nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Pemilihan terhadap metode ekstraksi disesuaikan dengan kepentingan dalam memperoleh sari yang baik (Amita, *et al.*, 2014).

Dalam proses ekstraksi, prinsip Ansel (Ansel, 2005) membagi Proses ekstraksi dibedakan menjadi dua fase dasar, yaitu fase pencucian dan fase ekstraksi. Fase pencucian adalah fase pertama, dimana sebagian bahan aktif berpindah ke dalam bahan pelarut. Semakin halus serbuk, maka semakin optimal jalannya proses pencucian. Fase ekstraksi merupakan fase dimana membran sel yang mengering dan menciut yang terdapat dalam ekstrak mula-mula harus diubah dalam suatu keadaan yang

memungkinkan suatu perlintasan bahan pelarut ke dalam bagian dalam sel. Hal itu terjadi melalui pembengkakan yang kemudian terbentuk ruang antar miselar, yang memungkinkan bahan ekstraksi mencapai ke dalam ruang sel secara osmose. Mengalirnya bahan pelarut ke dalam ruang sel menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya. Gaya yang bekerja adalah adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan cairan ekstraksi yang mula-mula masih tanpa bahan aktif yang mengelilinginya. Bahan kandungan sel akan mencapai ke dalam cairan di sebelah luar selama difusi melintasi membran sampai terbentuknya keseimbangan konsentrasi antara larutan di sebelah dalam dan larutan di sebelah luar sel.

Dalam metode Darwis (Boryana, *et al.*, 2007). Mengemukakan bahwa, terdapat beberapa metode yang digunakan untuk ekstraksi dengan bahan pelarut yaitu dengan cara dingin dan cara panas.

2.5.4.1 Cara dingin

- a. Maserasi, yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan atau pengocokan pada suhu ruangan.
- b. Perkolasi, yaitu metode umum ekstraksi yang bubuk ujinya dikemas dalam perkolator, dan pelarut ditambahkan terus menerus supaya meresap melalui kemasan bubuk dan dikumpulkan.

2.5.4.2 Cara panas

- a. *Refluks*, yaitu proses ekstraksi serbuk ekstrak menggunakan pelarut pada temperature titik didihnya, selama waktu tertentu, dan jumlah pelarut terbatas yang relative konstan dengan adanya pendinginan balik

- b. *Sohxlet*, yaitu menggunakan pelarut yang selalu baru yang dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi terus menerus dengan jumlah pelarut relative konstan dengan adanya pendinginan balik.
- c. *Digesti*, yaitu proses ekstraksi maserasi kinetik (pengadukan kontinu) pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar umumnya pada suhu 40-50°C
- d. *Infus*, yaitu sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada temperatur 90°C selama 15-20 menit.

2.6 Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM)

Keefektifan antimikroba terhadap bakteri berhubungan dengan konsep KHM. KHM adalah konsentrasi antimikroba terendah yang bisa menghambat pertumbuhan bakteri. KBM adalah konsentrasi antimikroba terendah yang bisa membunuh bakteri. Bakteri dikatakan mati apabila tidak tumbuh pada inokulasi ke dalam medium kultur yang secara normal mendukung pertumbuhannya.

KHM sangat penting dalam diagnosis laboratoris untuk mengkonfirmasi resistensi mikroorganisme terhadap bahan antimikroba dan juga untuk memonitor aktivitas bahan antimikroba baru. KHM biasanya berkenaan dengan pengukuran laboratoris dasar dari aktivitas bahan, antimikroba yang melawan mikroba (Brooks *et al.*, 2013).