

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN SELEDRI (*Apium graveolens L.*)  
TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *Streptococcus mutans*  
SECARA *IN VITRO***

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



Oleh :

Rayu Sili Diapuri

NIM : 0910713030

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2012**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN SELEDRI (*Apium graveolens*  
*L.*) TERHADAP PROSES AKUMULASI BIOFILM *Streptococcus mutans*  
SECARA *IN VITRO*

Oleh :

Rayu Sili Diapuri

NIM : 0910713030

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 14 Desember 2012

dan dinyatakan lulus oleh

Penguji I

dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM  
NIP 19670123 199601 1 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

dr. Roekistiningsih, DMM, MS, Sp.MK (K)  
NIP 19490206 197803 2 001

dr. Mudjiwiyono HE, MS, Sp.PA  
NIP 19510526 198003 1 003

Mengetahui

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof.Dr. dr.Teguh Wahyu Sardjono,DTM&H, M.Sc, Sp.Par.K.  
NIP 19520410 198002 1 001

## KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmatNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Efek Ekstrak Etanol Daun Seledri (*Apium graveolens L.*) Terhadap Pembentukan Biofilm *Streptococcus mutans* Secara *in Vitro*”. Ketertarikan penulis akan topik ini didasari oleh fakta bahwa terdapat beberapa penyakit sistemik yang pada dasarnya bermula dari pembentukan karies gigi.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Allah swt serta kedua orang tua dan keluarga tercinta untuk Bapak, Ibu, Mas Ifan , Mbak Mayya dan Ryan yang selalu menemani dan tak pernah henti mengirimkan doa serta memberi masukan yang membangun dan motivasi yang tiada henti.

Tugas Akhir ini dibuat untuk memenuhi salah satu syarat dalam memperoleh gelar sarjana Kedokteran Umum di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Dalam penyusunannya, banyak pihak yang telah memberikan bantuan yang begitu banyak hingga tugas akhir ini dapat terselesaikan. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA, selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
2. Prof. Dr. dr.Teguh Wahyu Sardjono,DTM&H, M.Sc, Sp.Par.K., selaku Ketua Jurusan kedokteran Universitas Brawijaya Malang
3. dr. Roekistiningsih, DMM, MS, Sp.MK (K) selaku pembimbing pertama yang telah banyak membantu dengan saran-saran bermanfaat dan motivasi selama penulis menyelesaikan tugas akhir ini.

4. dr. Mudjiwiyono HE, MS, Sp.PA, selaku pembimbing kedua yang telah membantu memberikan bimbingan sehingga penulisan tugas akhir ini berjalan dengan baik dan lancar.
5. dr. Hidayat Sujuti, Ph.D, SpM, selaku penguji pertama yang telah membantu dalam memberi kritik dan saran yang membangun pada penulisan tugas akhir ini.
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
7. Mbak Uci, Mas Slamet, Bu Yati dan juga untuk seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi FKUB.
8. Teman-teman Fakultas Kedokteran Angkatan 2007, 2008, 2009 dan sesama peneliti di Laboratorium Mikrobiologi. Terima kasih atas saran dan semangat yang diberikan selama proses penelitian berlangsung.
9. TOA, teman yang selalu menemani penulis dalam susah dan senang. Terima kasih atas solidaritas dan motivasi yang tiada henti.
10. Segenap keluarga Vidatra Angkatan 28 yang selalu peduli dan memberikan semangat dalam menjalani proses perkuliahan.
11. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas bantuannya kepada penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Desember 2012

Penulis

## ABSTRAK

Diapuri, Rayu Sili. 2012. **Efek Ekstrak Etanol Daun Seledri (*Apium graveolens L.*) Terhadap Pembentukan Biofilm *Streptococcus mutans* Secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Roekistiningsih, DMM, MS, Sp.MK, (K) (2) dr. Mudjiwiyono HE, MS, Sp.PA

Karies merupakan proses patologik kerusakan jaringan gigi oleh mikroorganisme. *Streptococcus mutans* adalah etiologi utama terjadinya karies gigi. Karies gigi diinisiasi oleh adanya perlekatan *Streptococcus mutans* pada permukaan gigi dan diikuti dengan kolonisasi dan akumulasi biofilm. Untuk itu perlu adanya suatu bahan yang bisa berperan sebagai antibiofilm. Salah satunya adalah daun seledri (*Apium graveolens L.*) yang memiliki berbagai kandungan berkhasiat untuk pengobatan penyakit. Kandungan *Tannin* dan *Apigenin* pada daun seledri diduga dapat menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan *Streptococcus mutans*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak daun seledri pada penghambatan pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan *Post Test Only Control Group Design*. Metode yang digunakan adalah *Congo Red Agar* sebagai metode kualitatif dan *Microtiter Plate* sebagai metode kuantitatif. Konsentrasi ekstrak daun seledri yang digunakan adalah 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029 dan kontrol positif. Hasil perlakuan diukur dengan menggunakan Spektrofotometer untuk melihat *Optical Density* (OD) dari biofilm. OD biofilm bakteri dengan pemberian ekstrak (semua konsentrasi) lebih rendah secara signifikan daripada OD biofilm bakteri tanpa ekstrak. Maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) memiliki efek antibiofilm terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

Kata Kunci : *Streptococcus mutans*, daun seledri (*Apium graveolens L.*), Antibiofilm, *Congo red agar*, *Microtiter Plate*.

## ABSTRACT

Diapuri, Rayu Sili. 2012. **The Effect Of Celery Leaf (*Apium graveolens L.*) Ethanol Extract Toward *Streptococcus mutans* Biofilm Formation In Vitro**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor : (1) dr. Roekistiningsih, DMM, MS, Sp.MK (K) (2) dr. Mudjiwiyono HE, MS, Sp.PA.

Caries is a pathological destructive process of tooth structure by microorganism. *Streptococcus mutans* is a major etiologic bacteria of human dental caries. Dental caries is initiated by adhesion of *Streptococcus mutans* to tooth surface followed by colonization and accumulation of this bacteria to form dental biofilm. For it is necessary the presence of a substance that can act as antibiofilm. One of them is celery leaves (*Apium graveolens L.*) that have a range of efficacious for the treatment of disease. The content of Tannin and Apigenin in celery leaves is thought to inhibit the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. The purpose of this research is to know the effects of celery leaves extract on the inhibition of biofilm formation of *Streptococcus mutans in vitro*. This research is experimental research with *Post Test Only Control Group Design*. The method is used one qualitative (*Congo Red Agar*) and one quantitative (*Microtiter Plate Test*). Celery leaves concentration is 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029 and control positive. The result of this research were measured using Spectrofotometer is required to view the *Optical Density (OD)* of the biofilm. OD Biofilm of bacteria by administered the extract (all concentration) was significantly lower than the bacterial biofilm OD without extract. Then it can be inferred that the extract of celery leaves (*Apium graveolens L.*) has the effect antibiofilm of *Streptococcus mutans*.

Keyword : *Streptococcus mutans*, Celery leaves (*Apium graveolens L.*), Antibiofilm, *Congo red agar*, *Microtiter Plate*.

DAFTAR ISI

Halaman

Judul .....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak .....	v
Abstract .....	vi
Daftar Isi .....	vii
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Lampiran .....	xiii
 <b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1 Tujuan Umum .....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Manfaat Akademis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
 <b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Daun Seledri .....	5
2.2.1 Taksonomi.....	5
2.2.2 Morfologi Tanaman.....	6
2.2.3 Habitat.....	6



2.2.4 Kandungan Kimia.....	7
2.2.4.1 Flavonoid.....	7
2.2.4.2 Apigenin.....	7
2.2.4.3 Saponin.....	8
2.2.4.4 Tannin.....	8
2.2.4 Manfaat dan efek farmakologi.....	9
2.2 <i>Streptococcus Mutans</i> .....	9
2.2.1 Taksonomi .....	10
2.2.2 Karakteristik Bakteri.....	11
2.2.3 Struktur Antigen.....	11
2.2.4 Metabolisme <i>Streptococcus mutans</i> .....	12
2.2.5 Enzim <i>Streptococcus mutans</i> .....	13
2.2.5.1 Enzim <i>Glucocyltransferase</i> .....	13
2.2.5.2 Enzim <i>Fructocyltransferase</i> .....	14
2.3 Biofilm.....	15
2.3.1 Definisi.....	15
2.3.2 Komposisi dan Struktur Biofilm.....	15
2.3.3 Pembentukan Biofilm .....	17
2.3.4 Pengaruh Negatif Biofilm pada Kehidupan manusia.....	18
2.3.5 Fungsi biofilm Bagi bakteri.....	19

### **BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konsep .....	21
3.2 Hipotesis Penelitian .....	22

## BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian .....	23
4.2 Tempat dan waktu Penelitian.....	23
4.3 Populasi dan Sampel.....	23
4.4 Variabel Penelitian.....	24
4.4.1 Variabel bebas .....	24
4.4.2 Variabel tergantung.....	25
4.5 Definisi Operasional .....	25
4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian.....	26
4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Seledri.....	26
4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri.....	27
4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm pada efek Anti Biofilm.....	27
4.7 Metode Pengumpulan data.....	28
4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi Daun Seledri.....	28
4.7.1.1 Proses Ekstraksi.....	28
4.7.1.2 Proses Evaporasi.....	29
4.7.2 Identifikasi Bakteri.....	30
4.7.2.1 Pemeriksaan Mikroskopis.....	30
4.7.2.2 Tes Katalase.....	31
4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri.....	31
4.7.4 Deteksi Pembentukan Biofilm.....	32
4.7.5 Uji Hambatan Pembentukan Biofilm.....	32
4.8 Analisis Data.....	33
4.9 Skema Prosedur Penelitian.....	34

**BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

5.1 Hasil Penelitian.....	35
5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri.....	35
5.1.2 Hasil Uji Pembentukan Biofilm.....	37
5.1.3 Hasil Uji Efektivitas Daun Seledri Terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm.....	37
5.2 Analisis Data.....	40
5.2.1 Uji <i>One-way Anova</i> .....	40
5.2.2 <i>Post-Hoc Multiple Comparison Test</i> .....	41

<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	45
-------------------------------	----

**BAB 7 PENUTUP**

7.1 Kesimpulan.....	50
7.2 Saran.....	50

<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	52
-----------------------------	----

<b>LAMPIRAN</b> .....	57
-----------------------	----

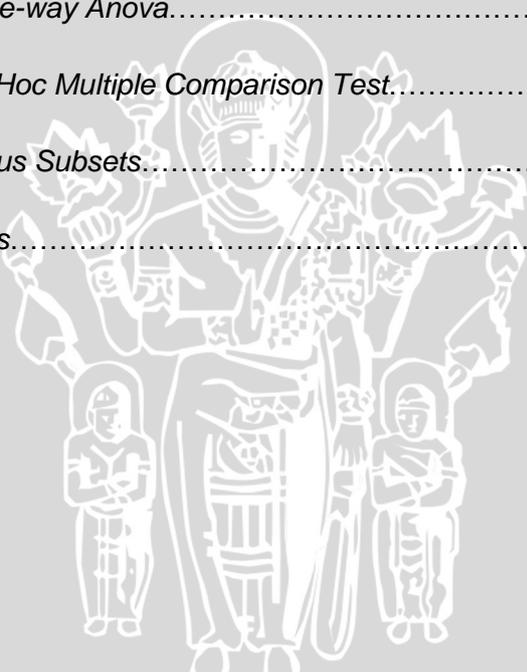


## DAFTAR GAMBAR

No Gambar	Judul	Halaman
Gambar 2.1	Tanaman Seledri.....	5
Gambar 2.2	Simplisia Kering Daun Seledri.....	5
Gambar 2.3	Pewarnaan Gram dari <i>Streptococcus mutans</i> pada <i>Thioglycollate Broth Culture</i> .....	11
Gambar 2.4	Pembentukan Biofilm yang Meliputi 5 Tahap.....	18
Gambar 3.1	Skema Kerangka Konsep Penelitian.....	21
Gambar 5.1	<i>Streptococcus mutans</i> pada <i>Brain Heart Infusion Agar Plate</i> ....	36
Gambar 5.2	Pengecatan Gram <i>Streptococcus mutans</i> .....	36
Gambar 5.3	Uji Katalase <i>Streptococcus mutans</i> .....	36
Gambar 5.4	<i>Streptococcus mutans</i> pada medium <i>Congo Red Agar</i> .....	37
Gambar 5.5	Uji Efektivitas Daun Seledri Terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Streptococcus mutans</i> .....	38
Gambar 5.6	Grafik mean OD Biofilm.....	39

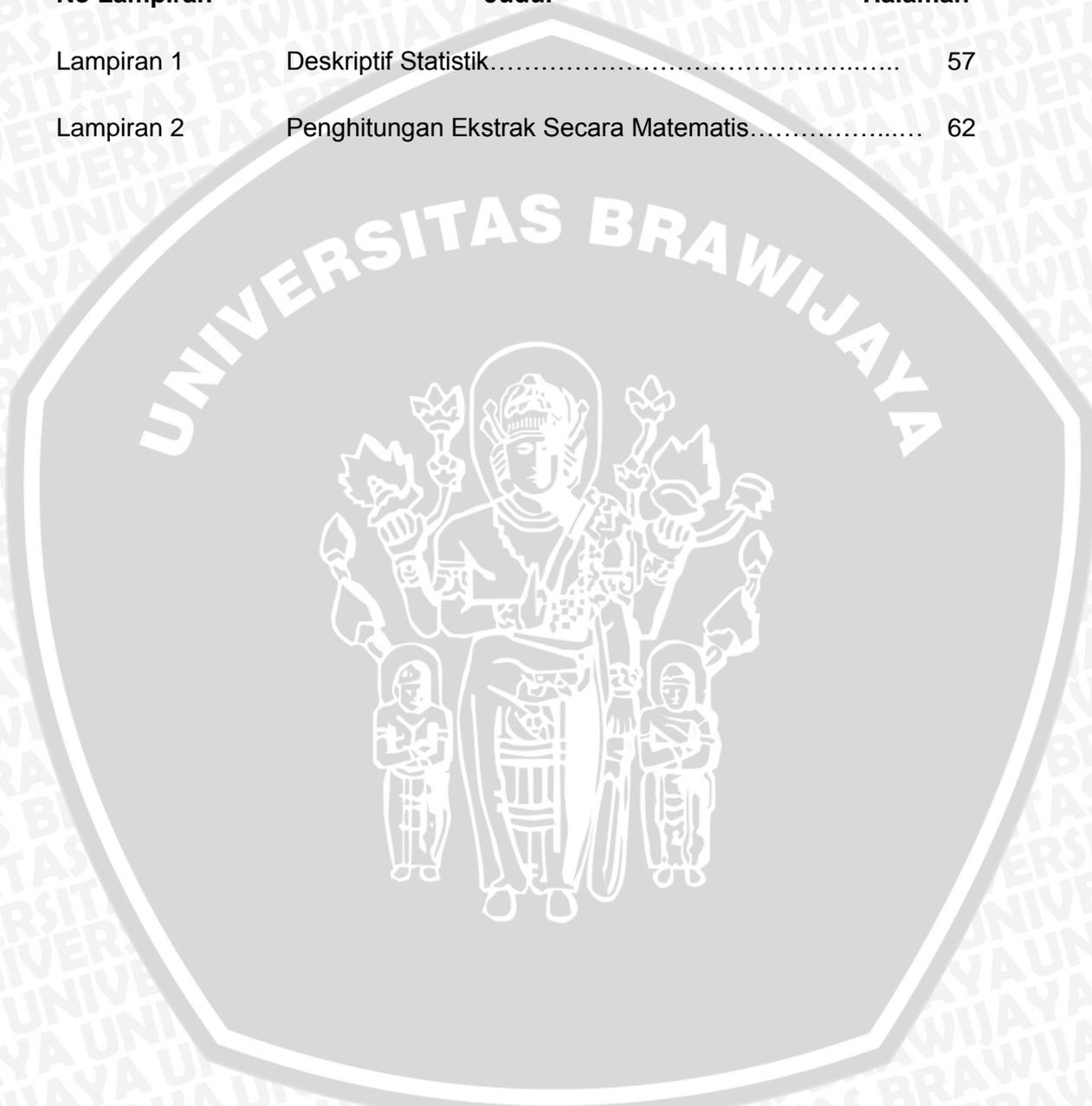
DAFTAR TABEL

No Tabel	Judul	Halaman
Tabel 2.1	Subdivisi <i>Streptococcus mutans</i> .....	10
Tabel 5.1	Hasil Pengukuran Spektrofotometer OD Biofilm.....	39
Tabel 5.2	Tes Normalitas.....	40
Tabel 5.3	Nilai Varians.....	41
Tabel 5.4	Nilai Uji <i>One-way Anova</i> .....	41
Tabel 5.5	Hasil <i>Post-Hoc Multiple Comparison Test</i> .....	42
Tabel 5.6	<i>Homogenous Subsets</i> .....	43
Tabel 5.7	<i>Correlations</i> .....	44



## DAFTAR LAMPIRAN

No Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1	Deskriptif Statistik.....	57
Lampiran 2	Penghitungan Ekstrak Secara Matematis.....	62



## BAB 1

## PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Plak gigi merupakan salah satu masalah kesehatan gigi dan mulut yang terjadi akibat pertumbuhan mikroba mulut yang membentuk suatu biofilm (Marsh, 2006). Prevalensi plak gigi di Indonesia yang dilaporkan dalam profil Kesehatan Gigi dan Mulut pada Pelita VI mencapai 70-80%. Selain mengurangi estetika, jika terjadi penumpukan plak gigi secara berkala dapat menimbulkan karies gigi dan peradangan gusi atau gingivitis. Di Indonesia, angka kejadian karies gigi berkisar antara 85%-99%, sedangkan gingivitis menyerang 75-90% populasi di seluruh dunia (Sariningrum, 2009).

Bakteri yang berperan penting dalam pembentukan plak gigi adalah bakteri yang mampu membentuk polisakarida ekstraseluler yaitu bakteri dari genus *Streptococcus*. Bakteri *Streptococcus* yang ditemukan dalam jumlah besar sekitar 94% pada plak penderita karies dengan membentuk biofilm adalah *Streptococcus mutans* (Roeslan, 1996). *Streptococcus mutans* merupakan kuman yang kariogenik karena mampu membuat asam dari karbohidrat yang dapat diragikan. Bakteri tersebut dapat tumbuh subur dalam suasana asam dan dapat menempel pada permukaan gigi karena kemampuannya membuat polisakarida ekstra sel yang sangat lengket dari karbohidrat makanan. Polisakarida ini, yang terutama terdiri dari polimer glukosa, menyebabkan matriks plak gigi mempunyai konsistensi seperti gelatin. Akibatnya, bakteri-bakteri terbantu untuk melekat pada gigi serta saling melekat satu sama lain. Dan karena plak makin tebal maka hal ini akan menghambat fungsi saliva dalam menetralkan plak tersebut (Kidd and Joyston, 1991). Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa karies terjadi karena adanya

peran bakteri dalam rongga mulut seperti *Streptococcus mutans* yang memproduksi ekstraseluler polisakarida, seperti dekstran dan levan. Substansi ini memiliki peran dalam pembentukan plak dan perlekatan secara adhesi dari mikroorganisme. Setelah beberapa lama hasil produksi dari bakteri tersebut akan mengurangi enamel gigi kemudian terbentuklah karies (Newman, 1986). *Streptococcus mutans* dapat dibedakan dari jenis lainnya dengan melihat kemampuannya memfermentasi manitol dan membentuk glukon (Beighton, 1977).

Biofilm sendiri merupakan akumulasi dari pertumbuhan planktonik mikroba yang terdiri atas satu spesies atau lebih yang menempel dan menutupi suatu permukaan padat (Nobile dan Mitchell, 2007). Data telah menunjukkan bahwa matriks glukosa merupakan faktor yang utama yang mempengaruhi tingginya kariogenisitas pada plak gigi. Badan Kesehatan Nasional (Bethesda, Maryland, USA) memperkirakan bahwa biofilm menyebabkan lebih dari 80% penyakit infeksi (Schachter, 2003). Biofilm mulut menyimpan bakteri patogen yang merupakan kontributor utama faktor virulensi terkait dengan penyakit sistemik seperti pneumonia dan kardiovaskular (Li dkk., 2000).

Indonesia memiliki banyak tanaman yang diduga berkhasiat dan telah digunakan secara turun-temurun karena selain efek sampingnya relatif kecil juga harga yang lebih ekonomis. Pengobatan secara tradisional ini lebih menekankan pada keluhan-keluhan subyektif. Salah satu tanaman obat yang diharapkan peneliti bisa dijadikan sebagai obat tradisional untuk penyakit karies gigi adalah daun seledri (*Apium graveolens L.*). Tanaman ini banyak ditanam di sawah atau ladang, di kalangan masyarakat. Tanaman ini termasuk komoditi sayuran yang sangat populer. Daun seledri memiliki kandungan serat yang tinggi, aromanya menyengat dan rasanya sedikit pedas. Kandungan kimia daun seledri terdiri dari Minyak atsiri: Limonen, p-simol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -santalol,  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -kariofilen,

Flavonoid: Apiin, apigenin, isokuersitrin; Kumarin: Asparagin, bergapten, isopimpinelin, apiumetin, santotoksin; saponin; tannin ; sedanolida; asam sedanoat; manitol; kalsium; fosfor; besi; protein; glisidol; vitamin A, B1, B2, C dan K (BPOM RI, 2010).

Berdasarkan hal tersebut di atas, perlu dilakukan penelitian tentang efek dari ekstrak etanol daun seledri dalam menghambat proses akumulasi biofilm agar dapat memberikan informasi dengan dasar bukti yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan karies gigi.

## 1.2 Rumusan masalah

Apakah ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L.*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans*?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun seledri dalam menghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans*.

### 1.3.2 Tujuan khusus

Mengetahui *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) dari ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L.*) terhadap biofilm bakteri *Streptococcus mutans* secara in vitro.

Mengetahui efek penghambatan biofilm dari ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L.*) antara dosis ekstrak yang satu dengan dosis ekstrak yang lainnya.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

- a. Dapat menambah wawasan dalam menulis karya ilmiah dan dapat mengembangkan teori yang telah ada menjadi teori yang baru. Selain itu, mahasiswa akan terlatih untuk berpikir kritis dan kreatif dalam mencari lebih banyak informasi yang berkaitan dengan teori-teori tersebut.
- b. Dapat meningkatkan pengetahuan seputar pengobatan herbal di bidang ilmu kedokteran.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

- a. Sebagai informasi untuk meningkatkan pemahaman masyarakat tentang bahaya dari penyakit karies gigi.
- b. Sebagai informasi untuk meningkatkan pemahaman masyarakat tentang pemanfaatan seledri sebagai salah satu tanaman tradisional yang dapat dijadikan referensi dalam usaha meningkatkan kesehatan masyarakat.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Seledri

2.1.1 Taksonomi

- Kingdom : Plantarum
  - Divisi : Spermatophyta
  - Sub-divisi : Angiospermae
  - Kelas : Monocotyledoneae
  - Ordo : Umbelliferales
  - Famili : Umbelliferae
  - Genus : *Apium*
  - Species : *Apium graveolens* L.
- (Backer dan Van den Brink, 1965)



Gambar 2.1 Tanaman Seledri (BPOM RI, 2010)



Gambar 2.2 Simplisia kering daun seledri (BPOM RI, 2010)

### 2.1.2 Morfologi Tanaman

Tumbuhan berhabitus terna 1-2 tahun, tinggi dapat mencapai 0,8 m, tanaman berbau khas jika diremas. Akar tebal, berumbi kecil. Batang bersegi nyata, berlubang, tidak berambut. Daun majemuk menyirip sederhana atau beranak daun 3, anak daun melebar, pangkal berbentuk segitiga terbalik (pasak), hijau mengkilat, ujung daun bergerigi, setiap gerigi berambut pendek, pangkal tangkai daun umumnya melebar. Perbungaan berupa bunga majemuk payung, tanpa atau dengan tangkai tetapi panjangnya tidak lebih dari 2 cm, anak payung 6-15 cabang, ukuran 1-3 cm, 6-25 bunga, tangkai bunga 2-3 mm, daun mahkota putih-kehijauan atau putih-kekuningan, panjang mahkota bunga 0,5-0,75 mm. Panjang buah rata-rata 1 mm (BPOM RI, 2010).

Daun berwarna hijau kecoklatan sampai hijau kekuningan. Bau aromatik, khas, rasa agak asin, agak pedas dan menimbulkan rasa tebal di lidah. Daun majemuk, menyirip, tipis, rapuh, jumlah anak daun 3-7 helai. Batang dengan rusuk dan alur membujur, sisa pangkal tangkai daun terdapat di bagian ujung. Warna daun hijau mengkilat, bentuk belah ketupat miring, panjang 2-7,5 cm dan lebar 2-5 cm, pangkal dan ujung anak daun runcing, panjang tangkai daun sampai 2,5 cm, terputar, beralur membujur, panjang tangkai anak daun 1-2,7 cm (BPOM RI, 2010).

### 2.1.3 Habitat

Tumbuh di dataran rendah maupun tinggi pada ketinggian 1000–1200m dari permukaan laut. Perkebunan seledri di Indonesia terdapat di Sumatera Utara (Brastagi) dan Jawa Barat. Terdapat juga di Eropa (Inggris-Rusia Selatan), Asia Barat, Afrika Utara dan Selatan, Amerika Selatan dan dikultivasi di Amerika Utara dan Argentina (BPOM RI, 2010).

#### 2.1.4 Kandungan Kimia

Minyak atsiri terdiri dari Limonen, p-simol,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -santalol,  $\alpha$ -pinen,  $\alpha$ -kariofilen; Flavonoid terdiri dari Apiin, apigenin, isokuersitrin; Kumarin terdiri dari Asparagin, bergapten, isopimpinelin, apiumetin, santotoksin; Saponin; Tanin; Sedanolida; Asam sedanoat; Manitol; Kalsium; Fosfor; Besi; Protein; Glisidol; Vitamin A, B1, B2, C dan K (BPOM RI, 2010).

##### 2.1.4.1 Flavonoid

Flavonoid adalah molekul polifenol yang water soluble yang mengandung 15 atom karbon. Flavonoid ini termasuk dari famili *polyphenol*. Molekul ini bisa digambarkan sebagai dua cincin benzene yang bergabung dengan 3 rantai karbon pendek. Flavonoid terdiri dari enam bagian : calcone, flavones, flavonol, flavonone, anthocyanin dan isoflavonoids (Hahlbrock, 1981).

Manfaat Flavonoid diantaranya sebagai anti tumor, immunostimulant, antioksidan, antiinflamasi, antivirus, antifungal, anti diare, antihepatotoksik, anti hiperglikemi dan sebagai vasodilator (de Padua *et al.*, 1999).

Flavonoid memiliki efek anti mikroba karena kemampuannya berikatan dengan protein ekstraseluler dan membran sitoplasma dan bakteri. Semakin lipofilik suatu flavonoid, maka semakin kuat daya rusak flavonoid tersebut terhadap membran sitoplasma bakteri (Tsuchiya *et al.*, 1996).

##### 2.1.4.2 Apigenin

Apigenin merupakan komponen flavonoid utama dari seledri yang termasuk ke dalam golongan flavon. Apigenin dapat menghambat pembentukan biofilm dari *Streptococcus mutans* dengan cara menghambat pembentukan enzim *glucocyltransferase* yang mensintesa sukrosa menjadi glukukan (Harborne, 1986). Rumus molekulnya adalah  $C_{15}H_{10}O_5$  dengan bobot molekul 270,23

g/mol. Nama *International Union of Pure and Applied Chemistry* dari apigenin adalah 5,7-dihidroksi-2-(4- hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on. Titik leleh apigenin 345–350°C. Apigenin memiliki banyak kegunaan, salah satunya dalam bidang farmasi.

#### 2.1.4.3 Saponin

Saponin merupakan jenis glikosida yang merupakan zat aktif permukaan yang berasal dari tumbuhan yang larut dalam air yang membentuk larutan mirip sabun. Sehingga ketika saponin direaksikan dengan air dan dikocok maka akan terbentuk buih yang dapat bertahan lama. Saponin mudah larut dalam air dan tidak larut dalam eter. Saponin memiliki rasa pahit yang menusuk dan menyebabkan bersin serta iritasi pada selaput lendir. Saponin merupakan racun yang dapat menghancurkan butir darah atau hemolisis pada darah. Saponin bersifat racun bagi hewan berdarah dingin dan banyak diantaranya digunakan sebagai racun ikan. Saponin yang bersifat keras atau racun biasa disebut sebagai *Sapotoksin* (Tsuchiya *et al.*, 1996).

#### 2.1.4.4 Tannin

Tannin merupakan salah satu senyawa sekunder yang merupakan senyawa yang tidak terlibat langsung dalam proses metabolisme tumbuhan. Tannin memiliki kemampuan untuk mengikat protein dan membentuk kompleks tannin-protein (Preedy, 2008).

Berdasarkan perbedaan struktur molekul, tannin dibagi menjadi dua yaitu tannin terhidrolisis dan tannin terkondensasi. Tannin terhidrolisis mudah dihidrolisis oleh asam lemah atau basa lemah menghasilkan karbohidrat dan asam fenolat. Terdapat dua macam tannin terhidrolisis yaitu *gallotannin* (asam galat) dan *ellagitannin* (asam elagat). Sedangkan tannin terkondensasi atau

*proanthocyanidin* merupakan polimer dari 2 hingga 50 unit flavonoid yang dihubungkan oleh rantai karbon sehingga tidak mudah terhidrolisis. Terdapat dua macam tannin terkondensasi yaitu *procianidin* dan *prodelphinidin*. Proisianidin terdiri dari *epicatechin* dan *catechin*. Prodelphinidin terdiri dari *epigallocatechin* dan *gallocatechin* (Ho, 2001).

### 2.1.5 Manfaat dan Efek Farmakologi

Akar seledri berkhasiat memacu enzim pencernaan, sedangkan buah dan bijinya sebagai pereda kejang (antipasmodik), menurunkan kadar asam urat darah, antirematik, peluruh kencing (diuretik), peluruh kentut, afrodisak dan penenang (sedatif), ekstrak etanol herba seledri mempunyai efek mempercepat pertumbuhan rambut, antistres. Sedangkan herba berbau aromatik, rasanya manis, sedikit pedas dan sifatnya sejuk. Herba bersifat tonik, memacu enzim pencernaan (stomatik), menurunkan tekanan darah (hipotensif), penghenti pendarahan (hemostatis), pembersih darah dan memperbaiki fungsi hormon yang terganggu (Raharjo, 2006).

### 2.2 *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif. *Streptococcus mutans* merupakan fakultatif anaerob yang paling sering ditemukan pada rongga mulut dan berperan penting dalam proses terjadinya gigi berlubang. Mikroba ini pertama kali ditemukan oleh Clarke pada tahun 1924 (Clarke, 1924).

Clarke (1924) memberi nama *Streptococcus* karena morfologinya yang sangat bervariasi. Nama *mutans* merupakan hasil transisi dari bentuk kokus ke bentuk kokobasil. Sehingga *Streptococcus mutans* merupakan kumpulan dari

sel-sel berbentuk bulat atau oval yang tersusun seperti rantai atau berpasang-pasangan (Schuster, 1978).

### 2.2.1 Taksonomi

Klasifikasi *Streptococcus mutans* menurut Bergey dalam Capuccino (1998) adalah :

Kingdom	: Monera
Divisio	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Lactobacilalles
Family	: Streptococcaceae
Genus	: Streptococcus
Species	: <i>Streptococcus mutans</i>

Ada tujuh spesies *Streptococcus mutans* yang berbeda pada manusia dan hewan dan delapan serotip (a-h) yang diakui, berdasarkan sifat antigenic dari dinding sel karbohidratnya. *Streptococcus mutans* yang terdapat pada manusia terbatas pada tiga serotype (c,e dan f) (Samaranayake, 2002).

**Tabel 2.1 Subdivisi *Streptococcus mutans***

Serotipe	Nama Spesies	Hospes
c, e, f	<i>S. mutans</i>	Manusia
B	<i>S. rattus</i>	Tikus
A	<i>S. cricetus</i>	Hamster dan Manusia
d, g	<i>S. sobrinus</i>	Manusia
C	<i>S. ferus</i>	Tikus Liar
E	<i>S. downei</i>	Monyet berekor pendek
H	<i>S. macacae</i>	Monyet berekor pendek

(Rollins dan Joseph, 2000)

### 2.2.2 Karakteristik Bakteri

Karakteristik dari *Streptococcus mutans* adalah berbentuk bulat sampai lonjong dengan diameter 0,6-1,0  $\mu\text{m}$ , non motil, fakultatif anaerob, Gram positif, katalase negative, tidak berspora, tumbuh optimum pada suhu 37°C dengan pH antara 7,4-7,6. Morfologi koloni berwarna opak, berdiameter 0,5-1,0 mm, permukaannya kasar (hanya 7% yang licin dan bersifat mukoid) (Schuster, 1978). *Streptococcus mutans* termasuk jenis bakteri golongan *Streptococcus hemoliticus* tipe alpha yang secara normal dapat ditemukan dalam rongga mulut dan saluran napas bagian atas (Rollins dan Joseph, 2003)



**Gambar 2.3** Pewarnaan Gram dari *Streptococcus mutans* pada Thioglycollate Broth Culture

### 2.2.3 Struktur Antigen

*Streptococcus mutans* terdiri dari DNA sirkular, dan memiliki tiga yang berhubungan dengan plasmid yang berbeda. Ukuran plasmid ini adalah serupa, sekitar 5,6 kilobase (kb). Plasmid ini penting untuk *Streptococcus mutans* karena fungsi mereka, termasuk ketahanan terhadap antibiotik tertentu atau logam berat, produksi bakteriosin dan kekebalan, jalur katabolik dan mekanisme untuk konjugasi (Shigeyuki dan Suzanne, 1986).

Dinding selnya mengandung polimer umum yaitu peptidoglikan, kelompok polisakarida spesifik, protein dan gliserol membentuk asam teikoat dan asam liposeikoat. Adanya struktur mozaik pada polimer tersebut memungkinkan terjadinya reaksi permukaan sel. Peptidoglikan *Streptococcus mutans* mengandung asam glutamate, alanine, lisin, glikosamin dan asam muramat dengan rasio massa secara berurutan 1:2-4:1:1:1. Rantai *Streptococcus mutans* mengandung ikatan silang peptidoglikan dengan jembatan interpeptida yang terdiri atas L-alanin oligopeptida dan tronil-alanin peptide (Hamada dan Slade 1980).

Sejumlah gen yang mempengaruhi virulensi ditemukan. Gen ini termasuk *gtfB*, *gtfC*, dan gen *gtfD* coding untuk *glucosyltransferase*, yang *gbpA* dan gen *gbpC* pengkodean glukon-mengikat protein, SPAP mengungkapkan adhesi permukaan sel, dan gen *glgR* terlibat dalam penyimpanan polisakarida intraseluler. Selain itu, sejumlah gen lain yang telah ditunjukkan untuk mempengaruhi sifat virulensi potensial secara *in vitro* juga ditandai, termasuk beberapa yang terlibat dalam respon *Streptococcus mutans*. Gen ini FFH, DGK, *gbpB*, dan apurinic-apyrimidinic gen endonuklease (Vincent *et al.*, 2006).

#### **2.2.4 Metabolisme *Streptococcus mutans***

Secara umum, *Streptococcus mutans* dikenal karena kemampuannya untuk mensintesa polisakarida ekstraseluler dari sukrosa, mengalami agregasi sel ke sel ketika bercampur dengan sukrosa atau dekstran, dapat berkembang dalam lingkungan yang mengandung antibiotik sulfadimentin dan bacitrasin serta dapat memfermentasikan manitol dan atau sorbitol.

Sedangkan secara khusus, *Streptococcus mutans* mempunyai sifat dapat bertahan hidup dalam lingkungan yang bersifat asam (asidurik) dan dapat

menghasilkan asam (asidogenik). Bakteri ini memanfaatkan enzim *glucosyltransferase* (GTF) dan *fructocyltransferase* (FTF), yang berfungsi untuk mengubah sukrosa menjadi glukosa (dekstran) dan fruktosa (levan) dengan reaksi sebagai berikut :



Melalui pelikel ini bakteri *Streptococcus mutans* akan membuat kolonisasi di permukaan gigi serta membentuk lapisan dasar untuk formasi kompleks biofilm, yang dikenal sebagai plak gigi (Rollins dan Joseph, 2003).

Sukrosa adalah satu-satunya jenis yang dapat dimanfaatkan oleh *Streptococcus mutans* untuk membentuk pelikel. Sebaliknya banyak jenis gula, seperti glukosa, fruktosa, laktosa dan sukrosa dapat dicerna oleh *Streptococcus mutans* untuk menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir. Kombinasi dari kedua hal ini, dapat mengarah ke pembentukan karies gigi (Loesche, 1996).

## 2.2.5 Enzim *Streptococcus mutans*

### 2.2.5.1 Enzim *Glucocyltransferase*

Pada metabolisme karbohidrat, enzim *glucocyltransferase* menggunakan sukrosa untuk mensintesa molekul glukosa dengan berat molekul tinggi yang terdiri dari ikatan glukosa alfa (1-6) dan alfa (1-3) (Michalek dan Mc Ghee, 1982). Ikatan glukosa alfa (1-3) bersifat sangat pekat seperti lumpur, lengket dan tidak larut dalam air. Kelarutan ikatan glukosa alfa (1-3) dalam air sangat berpengaruh terhadap pembentukan koloni *Streptococcus mutans* pada permukaan gigi. Ikatan glukosa alfa (1-3) berfungsi pada perlekatan dan peningkatan koloni bakteri ini dalam kaitannya dengan pembentukan plak dan terjadinya karies gigi. (Roeslan dan Melanie, 1988).

### 2.2.5.2 Enzim *Fructocyltransferase*

Fruktan merupakan homopolimer dari fruktosa yang disintesis golongan enzim sukrosa, yaitu *fructocyltransferase* (FTF). FTF bakteri pada umumnya menghasilkan polimer levan. Pohon filogenetik dari enzim ini menunjukkan bahwa FTF dari bakteri bisa dibedakan antara (i) dari bakteri asam laktat, (ii) bacillus dan (iii) dari bakteri Gram negatif. Gen untuk *levansukrase* sudah pernah dikarakterisasi dari *Streptococcus mutans* dan *L. reuteri* (Van Hijum *et al.*, 2002; Van Geel-Schuten *et al.*, 1999).

Enzim ini mengandung sukrosa dan menggunakan energi yang dibebaskan untuk menggabungkan unit fruktosil ke rantai yang sedang tumbuh. Enzim *Fructocyltransferase* ini terdapat pada tumbuhan dan bakteri (Van Hijum *et al.*, 2002).

Fruktosa mengandung ikatan  $\beta$  (2-1),  $\beta$  (2-6), dan  $\beta$  (2-1-6) percabangan. Fruktan yang mengandung ikatan  $\beta$  (2-6) pada tulang punggungnya disebut *levan*, dan fruktan yang mengandung ikatan  $\beta$  (2-1) disebut *inulin*. FTF yang memproduksi levan dikenal juga dengan nama *levansukrase*, dan yang memproduksi inulin disebut *inulosukrase*. Tumbuhan umumnya memproduksi *inulin*, sementara mikroorganisme pada umumnya memproduksi *levan* dan *inulin*. Mikroorganisme yang memproduksi fruktan diantaranya: *Streptococcus*, *Bacillus* dan *Lactobacillus* (van Hijum *et al.*, 2002; Van Geel-Schuten *et al.*, 1999).

Pada bakteri, inulin disintesis oleh *inulosukrase* (sukrosa: 2,1- $\beta$ -D-fruktan 1-  $\beta$ -D fruktosiltransferase; E.C 2.4.1.9; reaksi 1) dan levan disintesis oleh *levansukrase* (sukrosa: 2,6- $\beta$ -D-fruktan 6-  $\beta$ -D fruktosiltransferase; E.C 2.4.1.10; reaksi 2) dengan reaksi :

1. Sukrosa + (2,1-β-D-fruktosyl)<sub>n</sub> → D-glukosa + (2,1-β-D-fruktosyl)<sub>n+1</sub>
2. Sukrosa + (2,6-β-D-fruktosyl)<sub>n</sub> → D-glukosa + (2,6-β-D-fruktosyl)<sub>n+1</sub>

## 2.3 Biofilm

### 2.3.1 Definisi

Biofilm merupakan suatu agregat mikroba sejenis maupun berbeda jenis yang melekat pada permukaan substrat biologis maupun non biologis. Dimana satu sel dengan sel yang lainnya saling terikat dan melekat pada substrat dengan perantaraan suatu matriks *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) atau disebut juga eksopolisakarida (Hall-Stoodley, 2004; Madigan *et al.*, 1997).

Biofilm adalah lapisan yang terbentuk oleh koloni sel-sel mikroba dan melekat pada permukaan substrat, berada dalam keadaan diam, karakter berlendir, dan tidak mudah terlepas (Madigan *et al.*, 1997).

Biofilm berkembang dari suatu matriks ekstraseluler yang terdiri atas DNA, protein, dan serabut polisakarida dari sel glikokaliks. Matriks melekat satu sel dengan yang lain dan juga pada permukaan substrat. Biofilm merupakan lingkungan mikro yang mengandung nutrisi dan melindungi koloni bakteri dari tekanan lingkungan, radiasi sinar ultraviolet, obat antimikroba, pH, suhu, dan kelembaban (Madigan *et al.*, 1997).

### 2.3.2 Komposisi dan Struktur Biofilm

Komposisi biofilm terdiri dari sel-sel mikroorganisme, produk ekstraseluler, detritus, polisakarida sebagai bahan pelekatan dan air yang adalah bahan penyusun utama biofilm dengan kandungan hingga 97% (Zhang XQ, 1998; Christensen, 1989). Polisakarida (polimer dari monosakarida atau gula sederhana) yang diproduksi oleh mikroba untuk membentuk biofilm termasuk

eksopolisakarida (EPS) yaitu polisakarida yang dikeluarkan dari dalam sel (Sutherland, 2001). EPS yang disintesis oleh sel mikroba berbeda-beda komposisi, sifat kimiawi dan sifat fisiknya. Beberapa adalah makromolekul yang bersifat netral, namun mayoritas bermuatan karena keberadaan asam uronat (Asam D-glukuronat), Asam D-galakturonat, dan Asam D-manuronat. Ada biofilm yang bersifat kaku karena EPS-nya terdiri dari ikatan  $\beta$ -1,4 atau  $\beta$ -1,3 glikosida (ikatan monosakarida monomer penyusun polisakarida) seperti EPS *xanthan gum* yang dihasilkan oleh *Xanthomonas campestris* tetapi ada juga yang bersifat fleksibel karena memiliki ikatan  $\alpha$ -1,2 atau  $\alpha$ -1,6 glikosida yang banyak ditemukan pada dekstran (Sutherland, 1990). Beberapa contoh EPS selain *xanthan gum* adalah asam kolanat yang diproduksi oleh *Escherichia coli*, alginat oleh *P. aeruginosa*, dan galaktoglukan oleh *Vibrio cholerae* (Watnick, 1999). Bahan-bahan penyusun biofilm yang lain contohnya adalah protein, lipid, dan lektin (Sutherland, 2001).

Struktur dari suatu biofilm adalah unik tergantung dari lingkungan tempatnya berada, contohnya adalah kandungan nutrisi dan keadaan fisik (Stoodley, 1999). Selain itu, di alam sangat jarang terdapat biofilm yang hanya terdiri dari satu spesies, biasanya biofilm tersusun dari beberapa spesies dalam lapisan-lapisan yang berbeda (Prescott, 2002).

Biasanya mikroorganisme fotosintetik ada di permukaan paling atas, mikroorganisme kemoorganotrof anaerob fakultatif di bagian tengah, sedangkan di bagian dasar adalah mikroorganisme anaerob pereduksi sulfat (Prescott, 2002). Pada bagian atas, cahaya matahari lebih mudah didapat sehingga dapat digunakan untuk fotosintesis, sedangkan bagian tengah dapat dihuni oleh mikroba kemoorganotrof fakultatif anaerob karena dapat mentolerir kandungan

udara yang sedikit serta banyak dapat mengakses bahan organik sebagai sumber energinya (Hogg, 2005).

Pada bagian dasar, tidak terdapat kandungan udara sehingga mikroba anaerob pereduksi sulfat dapat tumbuh dan mendapat energi dengan cara mereduksi sulfat (Hogg, 2005). Struktur biofilm yang lebih kompleks dapat berbentuk empat dimensi (x,y,z, dan waktu) dengan agregat sel, pori-pori, dan saluran penghubung. Tergantung dari kondisi lingkungannya, biofilm dapat menjadi sangat besar dan tebal sehingga dapat dilihat dengan mata telanjang contohnya pada lingkungan air laut dapat terbentuk stromatolit (Prescott, 2002). Struktur dan ukuran biofilm sangat bergantung pada konsentrasi substrat (Wimpenny, 1997).

### 2.3.3 Pembentukan Biofilm

Komunikasi antarsel penting bagi perkembangan dan pemeliharaan biofilm. Pelekatan suatu sel pada suatu permukaan adalah hasil dari sinyal untuk mengekspresikan gen-gen pembentuk biofilm. Gen-gen ini mengkodekan protein-protein untuk mensintesis sinyal komunikasi antarsel dan memulai pembentukan polisakarida (Madigan *et al.*, 2006). Pemicu pembentukan biofilm salah satunya adalah kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan (Wrangstad, 1990).

Ada 5 tahap pembentukan biofilm yaitu :

- a. Pelekatan Awal : Mikroba melekat pada permukaan suatu benda dan dapat diperantarai oleh pili atau rambut halus sel (Kus, 2004).
- b. Pelekatan Permanen : Mikroba melekat dengan bantuan eksopolisakarida (EPS) (Monroe, 2007).
- c. Maturasi I : Proses pematangan biofilm tahap awal (Monroe, 2007).

- d. Maturasi II : Proses pematangan biofilm tahap akhir, mikroba siap untuk menyebar (Monroe, 2007).
- e. Dispersi : Sebagian bakteri akan menyebar dan berkolonisasi di tempat lain (Monroe, 2007).



**Gambar 2.4 Pembentukan biofilm yang meliputi 5 tahap (Madigan *et al.*, 2006)**

### 2.3.4 Pengaruh Negatif Biofilm pada Kehidupan manusia

#### 1. Karies Gigi

Karies gigi disebabkan oleh biofilm dari matriks glukon yang dibentuk *Streptococcus mutans*. Biofilm tersebut melapisi enamel sehingga bakteri lain juga dapat melekat pada matriks tersebut dan membentuk plak gigi (Moskowitz *et al.*, 2004). Tingkat aktivitas karies gigi ditentukan menggunakan *Streptococcus mutans* sebagai indikator, caranya adalah menumbuhkan *Streptococcus mutans* dari sampel air liur pada medium buatan lalu dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Bila jumlah *Streptococcus mutans* >106/ml maka tingkat aktivitas karies gigi tinggi,

sedangkan *Streptococcus mutans* <105/ml maka aktivitas karies gigi termasuk rendah (Samaranayake, 2006).

## 2. Fibrosis Kistik

Penyakit ini disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* yang membentuk biofilm pada paru-paru sehingga menimbulkan gejala pneumonia (Moskowitz *et al.*, 2004).

## 3. Biofilm pada Peralatan Medis

Peralatan medis yang diimplantasikan ke dalam tubuh manusia seperti selang kateter dan sendi buatan sangat rentan terhadap pembentukan biofilm. Contoh mikroba yang sering ditemui membentuk biofilm pada selang kateter adalah *Candida albicans*. Mikroorganisme lainnya adalah bakteri Gram positif seperti *Corynebacterium spp*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, bakteri Gram negatif seperti *Acinetobacter spp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* (Romeo, 2008).

### 2.3.5 Fungsi Biofilm Bagi Bakteri

Alasan bakteri membentuk biofilm adalah karena daya tahan hidup meningkat dan pertumbuhan bakteri menjadi lebih baik (Madigan *et al.*, 2006).

Setidaknya ada empat alasan yang mendasari hal tersebut :

#### 1. Sebagai Pertahanan

Biofilm berfungsi sebagai mekanisme pertahanan bagi bakteri dengan cara meningkatkan resistensi terhadap gaya fisik yang dapat menyapu bersih sel-sel yang tidak menempel fagositosis oleh sel-sel sistem imun tubuh dan penetrasi dari senyawa beracun seperti antibiotik ( Madigan *et*

*al.*, 2006). Bakteri di dalam biofilm lebih resisten 10-1.000 kali dibandingkan bila tidak di dalam biofilm (Monroe, 2007).

2. Pelekatan pada relung

Dengan menggunakan biofilm, bakteri dapat melekat pada permukaan yang kaya akan nutrisi seperti jaringan sel hewan atau permukaan substrat yang mengalir contohnya permukaan batu dalam aliran air (Madigan *et al.*, 2006).

3. Kolonisasi

Pembentukan biofilm membantu sel-sel bakteri untuk hidup berdekatan dan membentuk koloni. Contohnya adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang berkoloni dengan biofilm sehingga memfasilitasi komunikasi antar sel dengan molekul sinyal dan meningkatkan peluang pertukaran materi genetik (Madigan *et al.*, 2006).

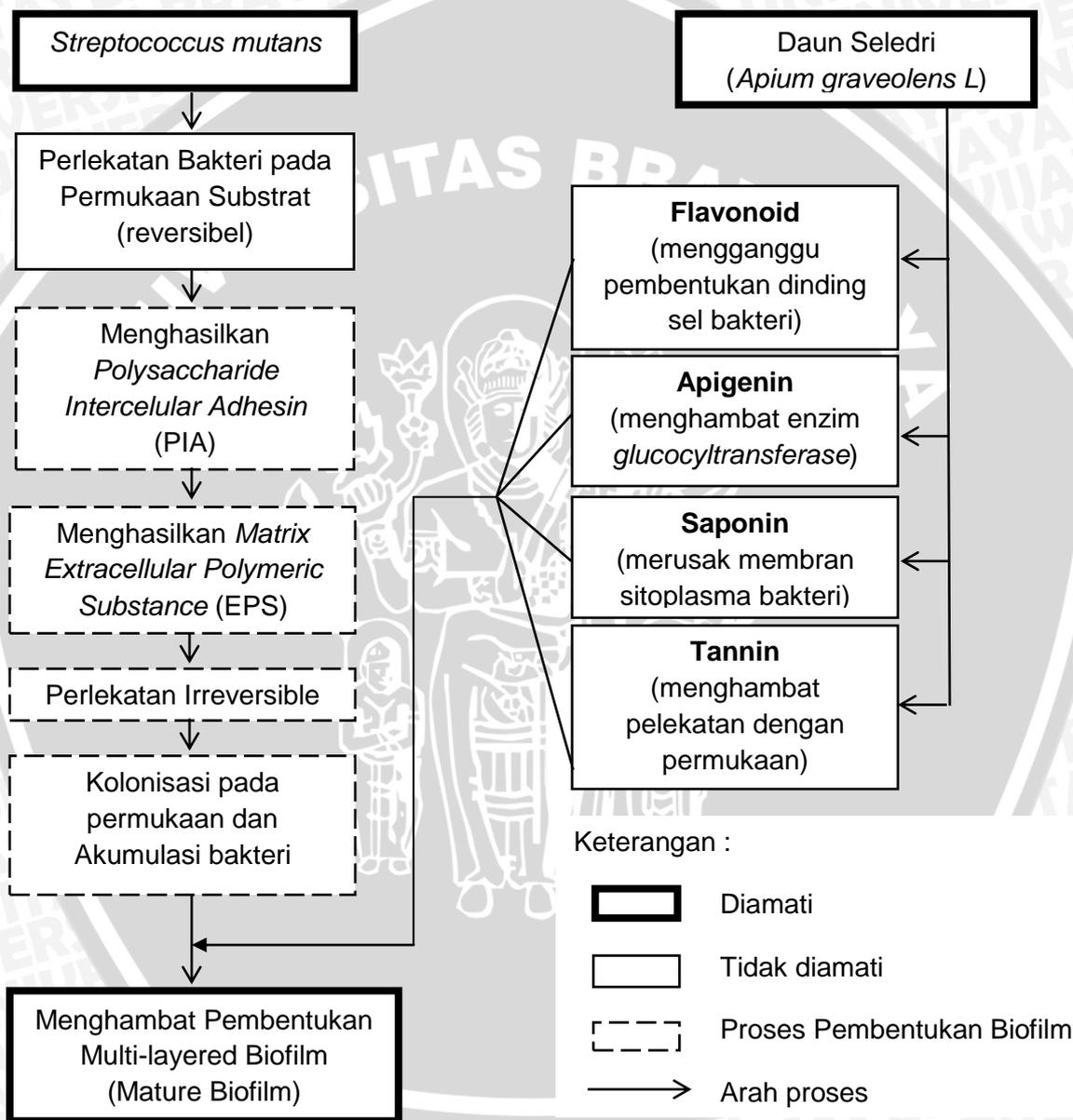
4. Cara hidup Alami Bakteri

Di alam, biofilm adalah cara hidup alami bagi beberapa bakteri tertentu dengan alasan terbatasnya nutrisi, tidak seperti medium buatan yang kaya akan nutrisi bagi bakteri (Madigan *et al.*, 2006).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep Penelitian



Kandungan senyawa aktif biologi yang terdapat dalam daun seledri antara lain flavonoid, saponin, tannin dan apigenin. Flavonoid memiliki efek anti mikroba karena memiliki kemampuan membentuk senyawa kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga mengganggu integritas dan merusak dinding bakteri yang menyebabkan bakteri lisis. Apigenin dapat menghambat pembentukan enzim *glucocyltransferase* (GTF) yang di produksi oleh *Streptococcus mutans*. Sehingga apigenin dapat mencegah akumulasi pembentukan glukosa berlebih yang disintesis dari sukrosa oleh *glucocyltransferase*. Saponin bersifat merusak membran sel bakteri dengan cara berikatan dengan kompleks polisakarida pada dinding sel. Tannin memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme Tannin sebagai anti mikroba adalah dengan mengganggu proses pembentukan dinding sel bakteri, serta dapat berikatan dan menginaktivasi protein adhesi yang terdapat pada reseptor permukaan bakteri. Empat zat ini akan menghambat perlekatan bakteri ke permukaan substrat sehingga terjadi penghambatan pembentukan biofilm. Hal ini yang mendasari dilakukannya penelitian ini.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Streptococcus mutans*.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini, digunakan penelitian eksperimental laboratorim (*True Experiment*) dengan design *Post test only control group design* dengan menggunakan metode *Microtiter Plate Test* untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L.*) sebagai penghambat proses akumulasi biofilm pada bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Proses pengekstrakan daun seledri menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029% dan kontrol positif (tanpa ekstrak).

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2012 sampai dengan Oktober 2012 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.3 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan daun seledri yang digunakan diekstrak di Laboratorium Kimia Politeknik Malang dan isolat bakteri

*Streptococcus mutans* dengan kepadatan  $10^8$  bakteri/ml yang dibeli dari Universitas Airlangga dan di kultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Besar konsentrasi yang digunakan, ditetapkan melalui eksperimen pendahuluan. Pada penelitian ini menggunakan 8 konsentrasi ekstrak daun seledri dan 1 kontrol positif, maka jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian dihitung dengan rumus :

$$p(n-1) \geq 15$$

$$8(n-1) \geq 15$$

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 2,9 \approx 3$$

(Solimun, 2001)

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (kontrol positif 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029% = 8 perlakuan)

Sehingga dalam penelitian ini dilakukan minimal tiga kali pengulangan.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Dalam penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah ekstrak etanol daun seledri dengan konsentrasi 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029% dan kontrol positif (tanpa pemberian ekstrak daun seledri).

#### 4.4.2 Variabel Tergantung

Dalam penelitian ini yang menjadi variabel terikat adalah akumulasi biofilm pada *Streptococcus mutans* yang dideteksi dengan Spektrofotometer.

#### 4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri kokobasil gram positif dan bakteri fakultatif anaerob. *Streptococcus mutans* yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Streptococcus mutans* yang membentuk biofilm, yang diketahui dengan melakukan *Congo Red Agar Test*.

4.5.2 Biofilm adalah komunitas bakteri yang memiliki karakteristik saling menempel satu sama lain secara irreversibel pada substrat atau permukaan yang lingkupi oleh sebuah matriks dari substansi polimer ekstraseluler yang diproduksinya. Biofilm yang digunakan dalam penelitian ini adalah biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *Streptococcus mutans*.

4.5.3 Ekstrak daun seledri yang dipakai dalam penelitian ini adalah hasil ekstraksi daun seledri dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang dianggap memiliki konsentrasi sebesar 100%. Daun seledri yang digunakan berasal dari Kota Malang.

4.5.4 Metode yang digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm adalah dengan *Congo Red Agar Plate*, dan menguji hambatan terhadap pembentukan biofilm adalah dengan metode *Micro titer-Plate*. Metode ini menggunakan *96-well microplate*.

4.5.5 Spektrofotometer dengan panjang gelombang 570nm adalah alat yang digunakan untuk menghitung *Optical Density* pada *well-microplate* yang diukur. Dari *Optical Density*, dapat ditentukan jumlah biofilm yang terbentuk di setiap *well-microplate*. Dari pengukuran ini akan didapatkan *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC). Spektrofotometer yang digunakan adalah milik Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Brawijaya.

4.5.6 *Optical Density* adalah suatu proporsi langsung dari konsentrasi senyawa yang berwarna. *Optical Density* akan terukur dalam bentuk *Absorbance Units*.

4.5.7 *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* adalah kadar minimal dari ekstrak daun seledri yang dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Streptococcus mutans*.

## 4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

### 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Seledri

1. Daun Seledri segar 918 gram.
2. Pelarut Ekstrak Etanol 96%.
3. Aquades
4. Oven
5. Blender
6. Saringan
7. Kertas saring
8. Neraca analitik
9. Seperangkat alat evaporasi vakum

- *Rotary evaporator*
- Pompa vakum
- Tabung Pendingin dan alat pompa sirkulasi air dingin
- Bak penampung air dingin
- Labu penampung hasil evaporasi
- Labu penampung etanol
- Batu didih
- Cawan penguap
- Alat pemanas aquades (water bath)
- Pipa plastik

#### 4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *Streptococcus mutans*
2. *Brain Heart Infusion Agar Plate*
3. Bahan Tes Katalase : H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 3%
4. Bahan Pengecatan Gram : Kristal violet, lugol, alkohol 95%, safranin
5. Minyak Emersi, alat ose dan mikroskop
6. Lampu Spiritus
7. Tabung Reaksi

#### 4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm pada Efek Anti Biofilm

1. Isolat *Streptococcus mutans*
2. *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*
3. *Congo Red Agar Plate*
4. *TSBglu*
5. *Phosphate buffered saline*

6. Ekstrak daun Seledri 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%;  
0,012%; 0,0059%; 0,0029%
7. 2% *crystal violet*
8. Isopropanol 5% dalam HCl 1M
9. Spektrofotometer

#### **4.7 Metode Pengumpulan Data**

##### **4.7.1 Ekstraksi dan Evaporasi Daun Seledri**

Metode yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun seledri ini adalah metode ekstraksi Soxhlet. Metode ini merupakan salah satu cara untuk memisahkan campuran padat-cair. Prinsip yang dilakukan adalah pemanasan (penguapan), kondensasi, dan proses pengekstrakan. Proses ekstraksi daun seledri dilakukan dengan cara maserasi, yaitu dengan pelaut etanol 96% karena pelarut etanol larut dalam air (Soxhlet, 1879).

##### **4.7.1.1 Proses Ekstraksi**

1. Daun Seledri segar atau basah 918 gram dikeringkan dengan sinar matahari secara tidak langsung atau diangin-anginkan.
2. Kemudian dimasukkan oven agar daun seledri tersebut menjadi kering secara sempurna dengan suhu oven 60°C.
3. Setelah kering, daun seledri di blender kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik sehingga didapatkan serbuk kering 111 gram, tetapi yang digunakan hanya 100 gram saja.
4. Kemudian serbuk daun seledri dibungkus kertas saring, dimasukkan ke dalam tabung untuk direndam dengan etanol.

5. Pelarut etanol dimasukkan ke dalam tabung tersebut sampai serbuk yang ada di dalam kertas saring terendam dalam pelarut etanol selama kurang lebih 1 minggu.
6. Hasil ekstrak etanol selanjutnya dievaporasi (untuk memisahkan ekstrak daun seledri dengan pelarut etanol).

#### 4.7.1.2 Proses Evaporasi

1. Alat evaporasi dirangkai sehingga membentuk sudut  $30^{\circ}$ - $40^{\circ}$ , dari bawah ke atas, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotary evaporator* dan tabung pendingin.
2. Selain tabung pendingin dihubungkan dengan alat pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak air dingin melalui pipa plastik, tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan labu penampung hasil penguapan.
3. Labu penampung hasil evaporasi diisi dengan hasil ekstraksi, kemudian dirangkai kembali, *rotary evaporatory*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum semua dinyalakan.
4. Pemanas aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut etanol mulai menguap.
5. Hasil penguapan etanol akan dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap yang lain disedot dengan alat pompa vakum.
6. Proses ini ditunggu hingga hasil ekstraksi yang di evaporasi volumenya berkurang dan menjadi kental.

7. Setelah kental, yang ditandai dengan batu-batu pengaduk yang ikut berputar, maka proses evaporasi dapat dihentikan dan hasil evaporasi pelarut yang tersisa.
8. Didapatkan ekstrak daun seledri 100% sejumlah 20 ml yang berupa pasta, kental, berwarna hijau tua, bau menyengat. Hasil inilah yang akan digunakan dalam percobaan.

#### 4.7.2 Identifikasi Bakteri

##### 4.7.2.1 Pemeriksaan Mikroskopis

###### 1. Pembuatan Sediaan Slide

- a. *Object glass* dibersihkan dengan kapas kemudian dilewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak yang ada. Setelah itu dibiarkan dingin terlebih dahulu.
- b. Satu ose aquades steril diteteskan pada *object glass*, kemudian biakan kuman diambil sedikit dengan menggunakan ose, kemudian di suspensikan dengan aquades pada *object glass* dan diratakan. Jika sediaan berbentuk cair, tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
- c. Sediaan di *object glass* dibiarkan kering di udara, kemudian difiksasi dengan cara di lewatkan di atas api.

###### 2. Pewarnaan Gram

- a. Setelah selesai di fiksasi, sediaan pada *object glass* siap untuk diwarnai dengan pewarnaan gram.
- b. Sediaan ditetesi dengan pewarna *crystal violet* (*primary stain*) selama 30 detik, setelah itu *crystal violet* dibuang dan sediaan dibilas dengan air perlahan-lahan.

- c. Sediaan ditetesi dengan lugol (*mordant*) dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian langsung dibilas dengan air.
- d. Setelah itu sediaan ditetesi dengan alkohol 95% (*decolorizing agents*) selama 10 detik, kemudian langsung dibilas dengan air.
- e. Sediaan ditetesi dengan safranin (*counter stain*), didiamkan selama 30 detik. Kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat dibawah mikroskop dengan pembesaran lensa objektif 100x ditambahkan minyak emersi.

#### 4.7.2.2 Tes Katalase

- a. Biakan bakteri diambil dan diusapkan pada *reaction card* dengan menggunakan ose.
- b. Kemudian menuangkan 1 tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% diatas bakteri yang telah lebih dulu diusapkan pada *reaction card*.
- c. Ada tidaknya pembentukan gelembung diamati selama beberapa detik.
- d. Jika terbentuk gelembung, berarti hasilnya katalase positif. Jika positif berarti bakteri *Staphylococcus spp.*, jika negatif berarti bakteri *Streptococcus spp.*

#### 4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

*Streptococcus mutans* yang sudah ditanam dalam medium *Brain Heart Infusion Agar Plate* diinokulasikan dalam medium *TSBglu* selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Suspensi bakteri *Streptococcus mutans* pada medium ini diukur dengan menggunakan

spektrofotometer diukur dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) = 610 nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya. Kemudian dengan rumus pengenceran  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ , untuk mendapatkan bakteri dengan kepadatan  $10^8$  bakteri/mL. Setelah itu diencerkan lagi dengan menggunakan *TSBglu* sebanyak dua kali, dengan cara mengambil sebanyak 1 mL perbenihan bakteri  $10^8$  bakteri/mL dan menambahkan sebanyak 9 mL *TSBglu*, kemudian ulangi sekali lagi sehingga pada akhirnya didapatkan kepadatan bakteri  $10^6$  bakteri/mL.

#### 4.7.4 Deteksi Pembentukan Biofilm

- Bakteri *Streptococcus mutans* diinokulasi pada *Congo Red Agar Plate* (0.8 gram), sukrosa (36 gram), Brain Heart Infusion Agar (52 gram) dan air (1000 mL) (Freeman et al., 1989).
- Kemudian *Congo Red Agar Plates* ini diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dan diteruskan selama semalaman dengan suhu ruangan ( $24^\circ\text{C}$ ).
- Jika terbentuk koloni hitam, maka hal tersebut menunjukkan strain bakteri yang memproduksi biofilm, jika koloni berwarna merah yang muncul, berarti strain tersebut tidak memproduksi biofilm.

#### 4.7.5 Uji Hambatan Pembentukan Biofilm

- Bakteri *Streptococcus mutans* dikultur semalaman di medium TSB di dilusi sampai 1:100 pada *TSBglu*.
- Kemudian 100  $\mu\text{l}$  *TSBglu*, dan 100  $\mu\text{l}$  *Streptococcus mutans* konsentrasi  $10^6$  bakteri/mL diisikan masing-masing pada *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate* dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu  $37^\circ\text{C}$ .

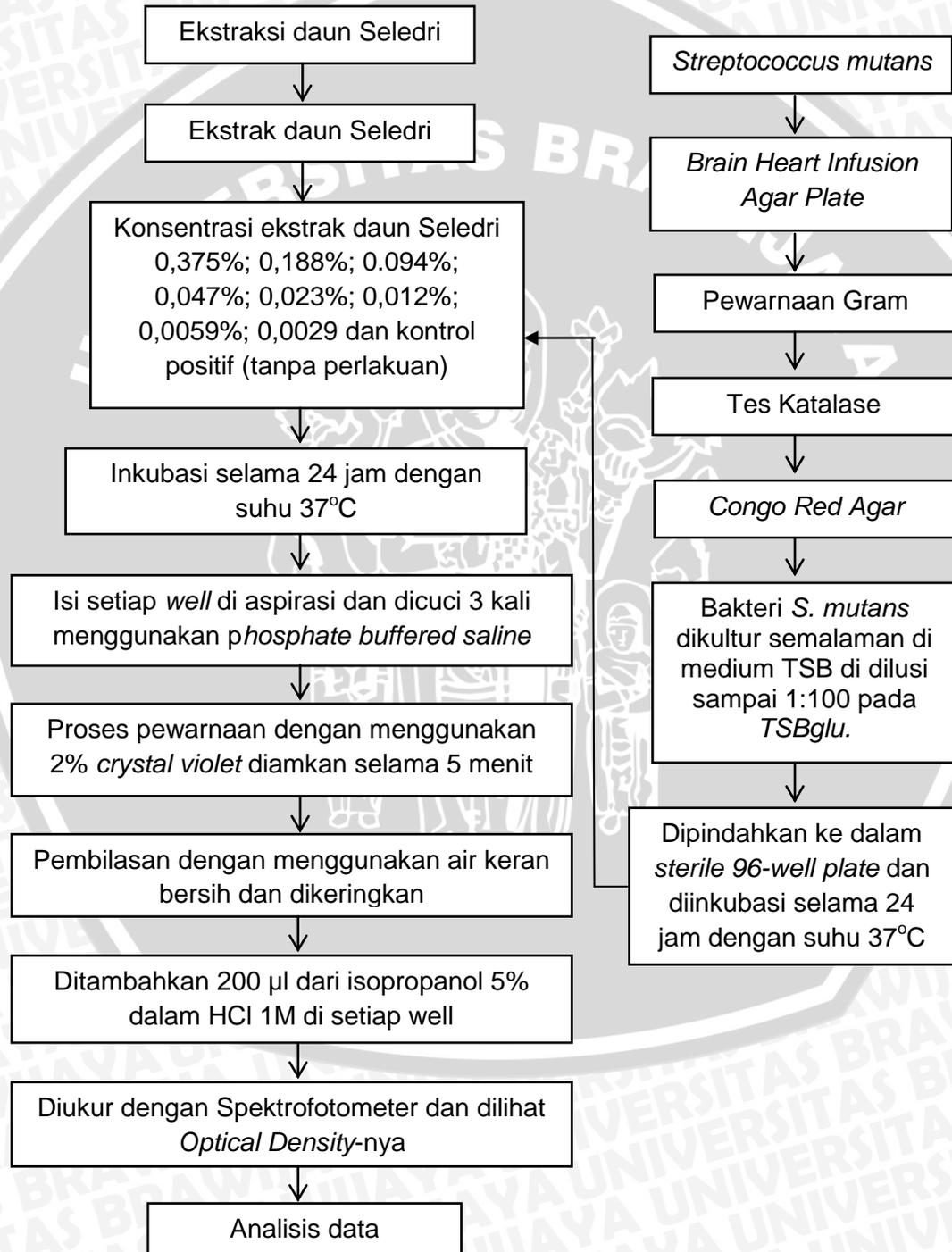
- c. Kemudian di tiap kolomnya ditambahkan 100  $\mu$ l *TSBglu* dan 100  $\mu$ l ekstrak dan seledri dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu Seledri 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029%; dan kontrol positif (tanpa ekstrak).
- d. Mikrotiter diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
- e. Setelah itu, isi setiap mikrotiter di aspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan *phospate-buffered saline* (pH 7,2) *well-plates* di kocok secara kuat untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel.
- f. Kemudian dicat dengan 2% *crystal violet* lalu diamkan 5 menit.
- g. Lalu dilakukan pembilasan berulang dengan menggunakan aquades dan dikeringkan.
- h. Untuk menganalisa secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200  $\mu$ l dari isopropanol 5% dalam 1M HCl di setiap well.
- i. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Prosedur keseluruhan ini diulang sebanyak tiga kali.

#### 4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari pembacaan di Spektrofotometer yang berupa *Optical Density* setiap *well-plates* yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian ekstrak daun seledri dengan konsentrasi 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029% dan kontrol positif (tanpa ekstrak). Analisis yang digunakan adalah uji *one-way Anova* dan *Post-Hoc Multiple Comparison*

Test. Semua perangkat analisis menggunakan fasilitas SPSS 20 dari Windows.

#### 4.9 Skema Prosedur penelitian



## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Streptococcus mutans* isolat pus yang didapatkan dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Bakteri *Streptococcus mutans* diinokulasikan pada medium *Brain Heart Infusion Agar Plate* selama 24 jam kemudian setelah itu dilakukan proses identifikasi dan uji pembentukan biofilm. Pada proses identifikasi, dilakukan pengecatan gram dan uji katalase. Sedangkan untuk menguji pembentukan biofilm dilakukan dengan menginokulasi bakteri pada medium *Congo Red Agar*. Setelah proses identifikasi selesai, baru dilakukan uji efektivitas ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L.*) dalam penghambatan pembentukan biofilm bakteri ini dengan menggunakan *Microtiter Plate Test* dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

##### 5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

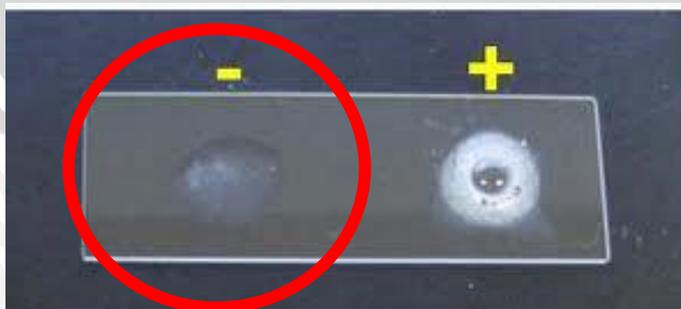
Pada medium *Brain Heart Infusion Agar Plate*, pertumbuhan bakteri menunjukkan koloni berwarna putih kekuningan (Gambar 5.1). Setelah itu dilakukan pengecatan gram pada koloni bakteri ini. Pada akhir proses pengecatan, dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan pembesaran obyektif 100 kali dengan minyak emersi. Didapatkan bakteri berbentuk bulat (*coccus*), susunan berderet dan berwarna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri ini Gram positif (Gambar 5.2). Kemudian bakteri *Streptococcus mutans* ini diuji katalase. Pada uji katalase, tidak didapatkan gelembung udara yang artinya katalase negatif (Gambar 5.3)



Gambar 5.1 *Streptococcus mutans* pada Brain Heart Infusion Agar Plate



Gambar 5.2 Pengecatan Gram *Streptococcus mutans*



Gambar 5.3 Uji katalase *Streptococcus mutans*

### 5.1.2 Hasil Uji Pembentukan Biofilm

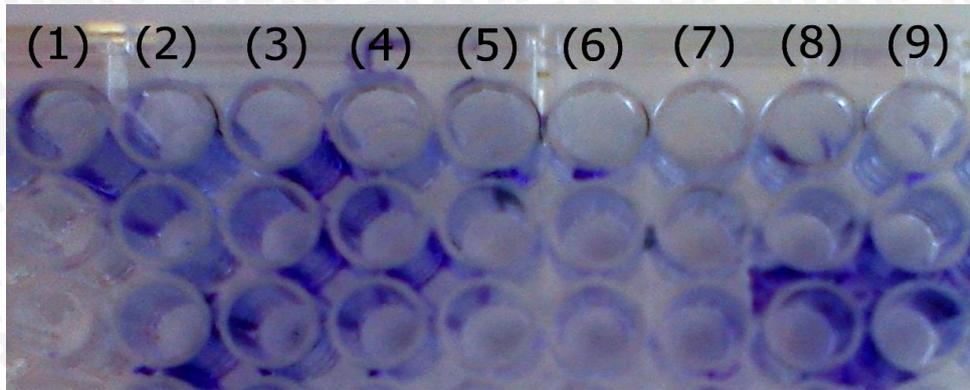
Untuk mengetahui apakah bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan biofilm maka dilakukan uji pembentukan biofilm dengan menginokulasikan bakteri pada medium *Congo Red Agar*. Hasilnya menunjukkan bakteri memunculkan warna hitam yang artinya bakteri *Streptococcus mutans* ini menghasilkan biofilm (Gambar 5.4).



**Gambar 5.4** *Streptococcus mutans* pada medium *Congo Red Agar Plate*

### 5.1.3 Hasil Uji Efektivitas Daun Seledri terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm

Setelah proses identifikasi dan uji pembentukan biofilm selesai, dilanjutkan dengan uji efektivitas daun seledri terhadap penghambatan pembentukan biofilm. Pada penelitian ini digunakan daun seledri dengan konsentrasi 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029% dan kontrol positif (tanpa ekstrak). Setelah melalui proses *Microtiter Plate Test*, secara kualitatif dapat terlihat hasil dari uji efektivitas ini sebagaimana pada Gambar 5.5.



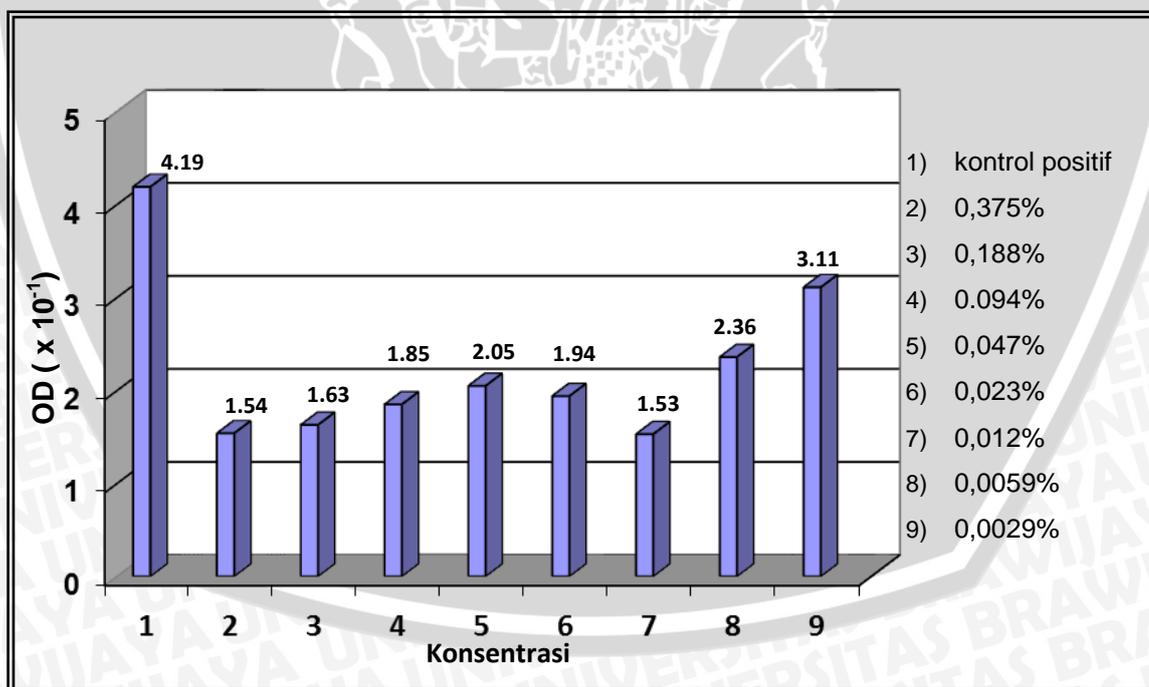
**Gambar 5.5 Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Seledri terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm *Streptococcus mutans***

(1) = 0% (kontrol Positif)	(6) = 0,023%
(2) = 0,375%	(7) = 0,012%
(3) = 0,188%	(8) = 0,0059%
(4) = 0,094%	(9) = 0,0029%
(5) = 0,047%	

Kemudian hasil ini dibaca pada Spektrofotometer dengan panjang gelombang sebesar 570 nm. Hasil yang didapatkan dari pengulangan tiga kali ini adalah berupa OD biofilm, yaitu sebagai berikut.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Spektrofotometer OD Biofilm ( $\times 10^{-1}$ )

(%)	1	2	3	mean	$\pm$ STD
Tanpa ekstrak	4.61	4.08	3.89	4.19	0.37
0,375	1.20	1.34	2.08	1.54	0.47
0,188	1.61	1.81	1.46	1.63	0.18
0,094	1.32	1.73	2.51	1.85	0.60
0,047	2.10	1.91	2.13	2.05	0.12
0,023	1.26	2.31	2.25	1.94	0.59
0,012	1.37	2.19	1.02	1.53	0.60
0,0059	2.22	1.43	3.42	2.36	1.00
0,0029	2.28	3.32	3.73	3.11	0.75



Gambar 5.6 Grafik Mean OD Biofilm

## 5.2 Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis dengan menggunakan analisis statistik SPSS versi 20 untuk Windows. Data Hasil pengukuran OD biofilm dengan menggunakan Spektrofotometer dianalisis dengan menggunakan Uji *One-way Anova*, kemudian dilanjutkan dengan *Post-Hoc Multiple Comparison Test*. Uji *One-way Anova* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok data, kemudian dilanjutkan dengan *Post-Hoc Multiple Comparison Test* untuk menentukan kelompok data mana yang memiliki perbedaan yang bermakna.

### 5.2.1 Uji *One-way Anova*

Sebelum menganalisis data hasil pengukuran OD biofilm dengan menggunakan metode *One-way Anova*, syaratnya harus terpenuhi terlebih dahulu, yaitu memiliki sebaran data yang normal dan varians yang sama. Data yang dimiliki dianalisis sebaran datanya, hasilnya sebagai berikut :

**Tabel 5.2 Tes Normalitas**

Tests of Normality						
Konsentrasi Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
.0000	.286	3	.	.931	3	.492
.0029	.277	3	.	.941	3	.531
.0059	.221	3	.	.986	3	.774
.0120	.270	3	.	.949	3	.565
OD Biofilm .0230	.367	3	.	.793	3	.097
.0470	.339	3	.	.850	3	.241
.0940	.247	3	.	.969	3	.661
.1880	.204	3	.	.993	3	.843
.3750	.331	3	.	.866	3	.284

a. Lilliefors Significance Correction

Dari tabel tersebut didapatkan  $p > 0.05$  dan dapat disimpulkan bahwa data ini memiliki sebaran yang normal. Syarat *One-way Anova* yang kedua adalah memiliki varians yang sama.

**Tabel 5.3 Nilai Varians**

Test of Homogeneity of Variances			
OD Biofilm			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.760	8	18	.152

Setelah dianalisis varians data ini, didapatkan  $p = 0.152$  ( $p > 0.05$ ), yang menunjukkan bahwa data ini memiliki varians yang sama. Setelah dua syarat ini terpenuhi, maka dapat dilakukan Uji *One-way Anova*.

**Tabel 5.4 Nilai Uji *One-way Anova***

ANOVA					
OD Biofilm					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.187	8	.023	6.915	.000
Within Groups	.061	18	.003		
Total	.248	26			

Dari analisis *One-way Anova* didapatkan nilai  $p = 0.000$  sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat sedikitnya dua kelompok data yang memiliki perbedaan OD biofilm secara bermakna. Data yang lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 1.**

### 5.2.2 *Post-Hoc Multiple Comparison Test*

Dari analisis menggunakan *One-way Anova* telah ditemukan bahwa terdapat sedikitnya dua kelompok data yang memiliki perbedaan OD biofilm secara bermakna. Untuk mengetahui kelompok data mana yang memiliki

perbedaan OD biofilm yang bermakna, maka dilakukan *Post-Hoc Multiple Comparison Test*. Metode *Post-Hoc* yang dipakai adalah *Tukey HSD*. Indikator yang digunakan untuk menentukan apakah perbedaan tersebut bermakna atau tidak adalah nilai signifikan pada tabel. Suatu nilai dianggap ada perbedaan secara bermakna jika nilai signifikansinya kurang dari 0.05. Berikut ini adalah hasil dari *Post-Hoc Multiple Comparison Test* yang memiliki nilai signifikansi kurang dari 0.05 :

**Tabel 5.5 Hasil *Post-Hoc Multiple Comparison Test***

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: OD Biofilm						
Tukey HSD						
(I) Konsentrasi Ekstrak	(J) Konsentrasi Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.0000	.0029	.108333	.047488	.400	-.05806	.27472
	.0059	.183667*	.047488	.024	.01728	.35006
	.0120	.266667*	.047488	.001	.10028	.43306
	.0230	.225333*	.047488	.004	.05894	.39172
	.0470	.214667*	.047488	.006	.04828	.38106
	.0940	.234000*	.047488	.003	.06761	.40039
	.1880	.256667*	.047488	.001	.09028	.42306
	.3750	.265333*	.047488	.001	.09894	.43172
.0029	.0000	-.108333	.047488	.400	-.27472	.05806
	.0059	.075333	.047488	.800	-.09106	.24172
	.0120	.158333	.047488	.069	-.00806	.32472
	.0230	.117000	.047488	.310	-.04939	.28339
	.0470	.106333	.047488	.423	-.06006	.27272
	.0940	.125667	.047488	.234	-.04072	.29206
	.1880	.148333	.047488	.103	-.01806	.31472
	.3750	.157000	.047488	.073	-.00939	.32339

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Dari tabel ini terlihat bahwa kelompok konsentrasi ekstrak 0 gr/ml memiliki perbedaan OD biofilm secara bermakna dengan kelompok konsentrasi ekstrak 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029%.

Kemudian dibawah ini adalah tabel dari *Homogenous Subsets* yang memperjelas maksud dari tabel *Multiple Comparison* di atas. Tabel ini memperlihatkan kelompok konsentrasi mana yang memiliki perbedaan bermakna dan kelompok konsentrasi mana yang tidak.

**Tabel 5.6 Homogenous Subsets**

OD Biofilm			
Tukey HSD			
Konsentrasi Ekstrak	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.0120	3	.15267	
.3750	3	.15400	
.1880	3	.16267	
.0940	3	.18533	
.0230	3	.19400	
.0470	3	.20467	
.0059	3	.23567	
.0029	3	.31100	.31100
.0000	3		.41933
Sig.		.069	.400

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Dalam tabel ini kelompok konsentrasi 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029% dikelompokkan menjadi satu karena tidak memiliki perbedaan yang signifikan antar satu dengan yang lain. Konsentrasi 0,0029% dan kontrol positif dikelompokkan menjadi satu juga tetapi terpisah dengan yang lain karena memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil analisis lengkap *Post-Hoc Multiple Comparison Test* dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

Tabel 5.7 Correlations

		Konsentrasi Ekstrak	OD Biofilm
Konsentrasi Ekstrak	Pearson Correlation	1	-.430*
	Sig. (2-tailed)		.025
	N	27	27
OD Biofilm	Pearson Correlation	-.430*	1
	Sig. (2-tailed)	.025	
	N	27	27

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Dari hasil data diatas, dapat dilihat pearson correlation tidak sama dengan 0.01 dan sig2tailed tidak kurang dari 0.05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data tidak mempunyai korelasi yang signifikan antara kadar konsentrasi ekstrak dan OD biofilm. Pada hasil penelitian, hal ini terlihat dari semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun seledri, pertumbuhan biofilm semakin tinggi pula, seharusnya semakin rendah. Dari hasil penelitian, didapatkan pula data dengan hasil OD biofilm yang tidak konsisten, terkadang naik terkadang turun lalu naik lagi. Maka dari itu *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* juga tidak dapat ditentukan.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L.*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Dalam penelitian ini digunakan metode *Microtiter Plate Test* yang merupakan suatu metode kuantitatif yang ditemukan oleh Stepanovic (1999). Sedangkan konsentrasi ekstrak daun seledri yang digunakan terdiri dari beberapa konsentrasi yang sebelumnya sudah dieksplorasi terlebih dahulu. Dengan melakukan prosedur-prosedur yang sudah ada dari metode *Microtiter Plate Test* ini, pada hasil akhirnya akan didapatkan suatu nilai OD (*Optical Density*) biofilm, yang diukur menggunakan Spektrofotometer. Nilai OD biofilm ini yang akan dianalisis untuk menjawab pertanyaan penelitian yang ada.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri hasil reidentifikasi yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *Streptococcus mutans*. Setelah proses identifikasi selesai, dilakukan uji pembentukan biofilm terhadap bakteri ini dengan menggunakan metode *Congo Red Agar Test*. Komposisi *Congo Red Agar* antara lain adalah *congo red dye* (0.8 gram), sukrosa (36 gram), Brain Heart Infusion Agar (52 gram) dan air (1000 mL) (Freeman et al., 1989). Dengan metode ini dapat dilihat apakah bakteri yang digunakan membentuk biofilm atau tidak. Caranya hanya dengan menginokulasikan bakteri pada medium *Congo Red Agar Plate* selama 24 jam. Hasil yang didapat adalah munculnya koloni berwarna hitam, yang berarti bahwa bakteri ini merupakan bakteri penghasil biofilm. Pembentukan koloni yang berwarna hitam ada hubungannya dengan keberadaan dari glukosa pada

medium ini (Mariana et al., 2009). Ada hasil penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa gen *sgp* dan *dgk* berperan penting dalam pembentukan biofilm dari *Streptococcus mutans* (Yoshida dan Howard,2002).

Sebelum dilakukan perlakuan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* penghasil biofilm ini, dilakukan eksplorasi konsentrasi ekstrak terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi yang akan dipakai dalam penelitian ini. Ekstrak daun seledri ini didapatkan dari pengestrakan daun seledri dengan menggunakan pelarut etanol 96% dan dilakukan dengan metode Soxhlet, pada akhirnya didapatkan hasil ekstraksi daun seledri 100% yang berupa pasta. Dari hasil eksplorasi pada konsentrasi 3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012% ditemukan konsentrasi yang menunjukkan adanya efek penghambatan mulai pada konsentrasi 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029%. Cara mendapatkan konsentrasi dalam persen ini dengan melakukan perhitungan matematis sebelumnya, yang perhitungan lengkapnya dapat dilihat di **Lampiran 2**.

Perlakuan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan metode *Microtiter Plate Test* ini dimulai setelah hasil eksplorasi sudah ditemukan. Pada pelaksanaannya, terdapat kesulitan dalam mendapatkan hasil yang memenuhi syarat untuk dibaca pada Spektrofotometer. Kesulitan tersebut adalah ekstrak yang digunakan memiliki karakter keruh, pekat dan berwarna gelap sehingga hasil pembacaan Spektrofotometer menjadi sulit. Harus dilakukan beberapa kali percobaan dalam melakukan prosedur ini. Pada akhir prosedur, didapatkan suatu nilai yaitu berupa *Optical density* (OD) biofilm. Keseluruhan prosedur ini diulang sebanyak tiga kali. Dari pengulangan sebanyak tiga kali ini, hasil yang didapatkan selalu menunjukkan bahwa semua konsentrasi dapat

menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan *Streptococcus mutans*, karena OD biofilm bakteri yang diberi perlakuan berupa ekstrak selalu lebih rendah dari OD biofilm bakteri yang tidak diberi ekstrak (kontrol positif).

Dilakukan analisis dengan menggunakan SPSS untuk memastikan apakah ada perbedaan pembentukan biofilm secara bermakna pada tiap konsentrasi. Setelah dilakukan analisis didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan OD biofilm yang signifikan antara perlakuan yang diberi ekstrak dengan perlakuan yang tidak diberi ekstrak (kontrol positif). Tetapi antara kelompok konsentrasi 0,375%; 0,188%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029%, OD biofilmnya tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini mungkin disebabkan oleh karakter ekstrak yang keruh, pekat dan berwarna, yang menyebabkan pembacaan OD biofilm pada Spektrofotometer kurang baik hasilnya. Selain itu ada kemungkinan dikarenakan dosis konsentrasi ekstrak yang sangat kecil hampir mendekati kontrol kuman. Kesimpulan dari analisis ini adalah semua konsentrasi ekstrak daun seledri yang digunakan dalam penelitian dapat menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan bakteri *Streptococcus mutans*, tetapi tidak akan memberikan hasil yang berbeda secara signifikan jika konsentrasi ekstrak daun seledri dinaikkan. Karakter ekstrak ini membuat hasil OD biofilm yang terbaca pada Spektrofotometer menjadi tidak konsisten, seperti yang terlihat pada grafik bahwa pada konsentrasi tertentu OD biofilmnya bisa tinggi, kemudian turun. Setelah turun, OD biofilm akan naik menjadi tinggi lagi. Karena hal ini *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* tidak dapat ditentukan. Kemungkinan faktor yang mempengaruhi nilai OD biofilm yang tidak konsisten adalah pilihan, proses dan metode ekstraksi yang kurang tepat, hasil ekstraksi yang begitu keruh, pekat dan

berwarna gelap, serta proses pelaksanaan penelitian yang kurang teliti dari segi waktu, prosedur, kesesuaian penggunaan alat dan bahan selama penelitian berlangsung.

Kesimpulan tentang kemampuan ekstrak daun seledri dapat menghambat pembentukan biofilm tersebut dapat dijelaskan dari teori yang sebelumnya sudah ada. Pada teori yang dijelaskan oleh H. Koo, Apigenin dapat menghambat enzim *glucocyltransferase* dimana enzim tersebut membantu *Streptococcus mutans* untuk mensintesis sukrosa menjadi glukosa, yang merupakan faktor utama untuk perkembangan dan terbentuknya biofilm kariogenik. Daun seledri memiliki kandungan apigenin tersebut. Didukung pula oleh kandungan lain yang ada di dalam daun seledri seperti Tannin yang dapat menghambat pelekatan dengan permukaan, Flavonoid yang dapat mengganggu pembentukan dinding sel bakteri dan Saponin yang membentuk larutan seperti sabun dapat merusak membran sitoplasma bakteri yang di dalamnya terdapat kandungan lemak sehingga lemak tersebut hilang sehingga membran tidak berfungsi sebagaimana mestinya, termasuk untuk melakukan pelekatan dengan permukaan substrat (Cushnie dan Lamb, 2005).

Dari penelitian sebelumnya, telah diketahui sejumlah gen yang mempengaruhi virulensi *Streptococcus mutans*. Gen ini termasuk *gtfB*, *gtfC*, dan *gtfD* coding untuk *glucosyltransferase*, yang *gbpA* dan *gbpC* pengkodean glukon-mengikat protein dan *glgR* terlibat dalam penyimpanan polisakarida intraseluler. Selain itu terdapat sejumlah gen lain yang mempengaruhi sifat virulensi yang sangat potensial pada *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Termasuk beberapa yang terlibat dalam respon *Streptococcus*

*mutans*. Yaitu gen FFH, DGK, gbpB, dan apurinic-apyrimidinic gen endonuklease (Vincent *et al.*, 2006).

Dengan melihat hasil penelitian yang telah dilakukan dan adanya teori tentang kandungan dari daun seledri yang dapat menghambat pembentukan biofilm, maka disimpulkan bahwa ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) terbukti mampu menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan *Streptococcus mutans*.

Pada penelitian biofilm yang lain (Nadia, 2011), bahan alam yang digunakan adalah daun salam. Pada daun salam terdapat bahan aktif tannin dan flavonoid yang diduga memiliki kemampuan menghambat biofilm. Konsentrasi daun salam yang digunakan mulai dari konsentrasi 0.03% sampai 4%. metode yang digunakan merupakan metode yang sama dengan penelitian ini (daun seledri), yaitu metode *Microtiter Plate Test*. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa bahan alam ini dapat menghambat pertumbuhan biofilm. Berdasarkan penelitian tersebut, terbukti bahwa bahan alam memang memiliki potensi sebagai agen penghambat biofilm yang dihasilkan oleh bakteri penghasil biofilm.

Dalam penelitian ini terdapat kendala penelitian berupa karakter ekstrak daun seledri yang keruh, pekat dan berwarna gelap, sehingga pembacaan di Spektrofotometer kurang baik. Karena hal ini, dimungkinkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada OD biofilm saat penambahan konsentrasi ekstrak dilakukan. Kelemahan ini yang harus diperhatikan dalam penelitian berikutnya, sehingga hasil yang dicapai selanjutnya bisa lebih baik lagi.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

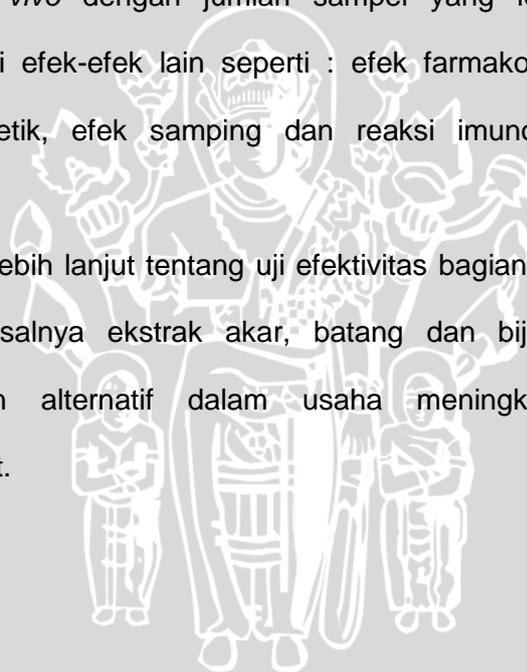
Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L.*) dapat menghambat pembentukan biofilm terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.
2. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* dengan menggunakan daun seledri (*Apium graveolens L.*) tidak dapat ditemukan pada penelitian ini.
3. Efek penghambatan biofilm dari ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens L.*) antara dosis ekstrak yang satu dengan dosis ekstrak yang lainnya tidak signifikan.

#### 7.2 Saran

1. Meneliti efektivitas ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) terhadap penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan bakteri *Streptococcus mutans* dengan menggunakan metode MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) atau metode XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide). Prosedur dari metode MTT dan metode XTT ini tidak dipengaruhi oleh karakter ekstrak yang keruh, pekat dan berwarna.
2. Meneliti efektivitas ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) terhadap penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan bakteri penghasil biofilm lainnya dan atau dengan menggunakan metode ekstraksi yang berbeda.

3. Meneliti efektivitas ekstrak daun seledri (*Apium graveolens L.*) terhadap Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) pada bakteri lainnya.
4. Penelitian lanjutan mengenai bentuk sediaan lain dari seledri yang mampu menghambat pembentukan biofilm pada permukaan gigi misalnya sediaan dalam bentuk pasta atau permen yang dikemas menarik dengan modifikasi rasa yang dapat menarik konsumen.
5. Penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas ekstrak daun seledri secara *in vivo* dengan jumlah sampel yang lebih besar untuk mengetahui efek-efek lain seperti : efek farmakodinamik dan efek farmakokinetik, efek samping dan reaksi imunologik yang lebih individual.
6. Penelitian lebih lanjut tentang uji efektivitas bagian lain dari tanaman seledri, misalnya ekstrak akar, batang dan biji seledri sebagai pengobatan alternatif dalam usaha meningkatkan kesehatan masyarakat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Backer, C.W., & Van Den Brink, R.C.B., 1965, *Flora of Java*, Netherlands: Noordhoft-Groningen, Hlm 41-43, 51-53.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan RI. 2010. *Acuan Sediaan Herbal* (Volume kelima Edisi Pertama). Direktorat Obat Asli Indonesia. Jakarta.
- Beighton, D. 1977. *The Effect of Cadmium on the Normal Tooth Fissure Plaque Flora of Sprague-Dawley Rats*. Arch Oral Biol 22:99-102.
- Christensen, BE. 1989. *The role of extracellular polysaccharides in biofilms*. J Biotechnol 10, 181-202.
- Clarke, JK. 1924. *On the bacterial factor in the etiology of dental caries*. Brit J Exp Pathol 5: 141-7
- Cushnie, T.P.T. dan A.J.Lamb. 2005. "Review : Antimicrobial Activity of Flavonoids". International Journal of Antimicrobial Agents [Online], Vol. 26 343-356.
- De Padua, L.S., N. Bunyaphatsara, and R.H.M.J. Lemmens, (Eds.), 1999, *Plant Resources of South East Asia no. 12(1). Medicinal and Poisonous plants 1*. PROSEA Foundation, Bogor, Indonesia, 185-190
- Devianca, Nadia. 2011. *Efek Ekstrak Daun Salam (Eugenia Polyanta) Terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm Pada Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Hahlbrock, Klaus. 1981. *Biochem Plants Volume 7*, 425-56. English : Academic New York
- Hall-Stoodley, L., Costerton JW, Stoodley P (February 2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases". Nature Reviews. Microbiology 2 (2): 95–108.
- Hamada S, Slade HD. 1980. *Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans*. Microbiol Rev 44:331-384.
- Harbone, J,B. 1986. *The Flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall
- Hogg S. 2005. *Essential Microbiology*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd. Hal:82.
- Ho,K.Y., CCT,J.S.Huang,C.P.Chen,T.C.Lin,C.C.Lin. 2001. *Antimicrobial activity of tannin components from Vaccinium vitis-idaea L. journal of Pharmacology and Pharmacology*. 53(2):187-91. Volume 53, Issue 2. pages 187–191.

Kidd, EAM, Joyston S. 1991. *Dental Caries : The Disease and Its Management*. EGC : Jakarta. p.3-4.

Koo, H, M.F.Hayacibara, B.D. Schobel. 2003. *Inhibition of Streptococcus mutans Biofilm Accumulation Polysaccharide Production by Apigenin and tt-farnesol*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2003) 52, 782-789.

Kus JV, Tullis E, Cvitkovitch DG, Burrows LL. 2004. *Significant differences in type IV pilin allele distribution among Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients*. Microbiology 150:1315-1326.

Li, X., Kolltveit, K.M., Tronstad L., & Olsen I., 2000, *Systemic Diseases Caused by Oral Infection*, Clin. Microbiol. Rev., **13**: 547-558.

Loesche, W.J., 1996, *Microbiology of Dental Decay and Periodontal Disease*, 4<sup>th</sup> Ed., 4, Galveston: Univ. of Texas Medical Branch, Hlm 203.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. and J. Parker, 1997, *Brock: Biology of Microorganisms*, 8<sup>th</sup> ed., Prentice-Hall, Inc., USA. Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*, 11<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall. Hal: 617-619.

Marsh, P. 2006, *Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease*, BMC Oral Health, **6** (Suppl. 1): S14.

Michalek, S.M., J.R. Mc Ghee, 1982, *Dental Microbiology*, Fourth Edition, Harper & Raw Publisher, Philadelphia.

Monroe D. 2007. *Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms*. PLoS Biol 5(11): 307

Moskowitz, et al.2004. *Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with cystic fibrosis*. J Clin Microbiol 42(5): 1915 - 22

Newman HN. 1986. The Relation between Plaque and Dental Caries. Journal of the Royal Society of Medicine Supplement. 14(79): 1-5.

Nobile, C.J., & Mitchell, A.P. 2007. *Microbial Biofilm : E Pluribus Unum*, *Current Biology*, **17**(10): R349-R353.

Preedy, Victor R. 2008. *Botanical medicine in clinical practice*. Department of Clinical Biochemistry, Kings College Hospital.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2002. *Microbiology*. Boston: McGraw-Hill. Hal:620-622

Raharjo, Danang. 2006. *Efek Antistres Ekstrak Etanol Herba Seledri (Erechthites valerianifolia) pada Mencit Putih Jantan dengan Metode Depressan/potensi narkose*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.

Roeslan, B., Melanie Errawan. 1988. *Sintesis Glukan oleh GT-ase Streptococcus mutans : mekanisme pembentukan plak gigi*. Majalah Ilmiah FKG Usakti, Th. III, No. 9, Universitas Trisakti, Jakarta.

Roeslan, Boedi Oetama. 1996. *Imunologi oral-kelainan dalam rongga mulut*, Jakarta: Balai penerbit FKUI, 2002: 121-3

Rollins, DM dan S.W. Joseph. *Streptococcus Summary*, (online), ([www.life.umd.edu/classroom/bsci424/index.html](http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/index.html), diakses 26 November 2011).

Romeo T. 2008. *Bacterial Biofilms* Berlin: Springer. Hal: 73, 13

Samaranayake, L.P. 2002. *Essential Microbiology for Dentistry*, 2<sup>nd</sup> ed. Hongkong : Churchill Livingstone.h.52

Samaranayake LP. 2006. *Essential Microbiology for Dentistry*. Edinburgh: Churchill Livinstone. Hal:271

Sariningrum, E., 2009. *Hubungan tingkat pendidikan, pengetahuan dan sikap orang tua tentang kebersihan gigi dan mulut pada anak balita usia 3-5 tahun dengan tingkat kejadian karies di PAUD Jatipurno*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi UMS, Surakarta.

Schachter, B. 2003. *Slimy Business-The Biotechnology of Biofilm*, *Nature Biotechnology*. **21**: 361-365.

Schuster, George S. 1978. *Oral Microbiology and Infectious Disease*, hal 172. (online), (<http://www.ncl.ac.uk/dental/oralbiol/oralenv/tutorials/streps.html>, diakses 2 desember 2012).

Shigeyuki Hamada, Suzanne M. Michalek, et al. 1986. *Molecular Microbiology and Immunobiology of Streptococcus mutans*. New York: Elsevier Science.

Solimun, 2001. *Kaidah dan Metode Analisis Data, Modul Penataran Analisis Data*. Universitas Pembangunan Nasional – UPN

Stanley NR, et al. 2004. *Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation*. *Mol Microbiol* 52(4): 917 - 24.

Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott HM. 1999. *Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure*. *J Appl Microbiol* 85: S19-S28.

Sutherland, I. W. 1990. *Biotechnology of Exopolysaccharides*. Cambridge: Cambridge University Press.

Sutherland, I. W. 2001. *Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework*. Microb 147:3-9

Todar, K., 2002, *Staphylococcus*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. (Online), (<http://www.bact.wisc.edu/>, diakses 29 november 2011).

Todar, Kenneth. 2008-2012. *Online Textbook of bacteriology*. (online), (<http://www.textbookbacteriology.net/index.html>, diakses 5 desember 2011).

Tsuchiya, H., M. Sato, T. Miyazaki, S. Fujiwara and S. Tanigaki *et al.*, 1996. *Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavones against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Ethenopharmacology, 50: 27-34.

Van Geel-Schuten, G.H., E.J. Faber, E. Smit, K. Bonting, M.R. Smith, B.T. Brink, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart, and L. Dijkhuizen. 1999. *Biochemical characterization of the glucan and fructan exopolisaccharides synthesized by the Lactobacillus reuteri wild type strain and by mutant strains*. Appl. And Env. Microbiol., vol. 65 no.7, 3008-3014.

Van Hijum, S.A.F.T., G.H. van Geel-Schuten, , H. Rahaoui, , M.J.E.C. van der Maarel, and L. Dijkhuizen. 2002. *Characterization of a novel fructosyltransferase from Lactobacillus reuteri that synthesizes high-molecular- weight inulin and inulin oligosaccharides*. Appl. And Env. Microbiol., vol. 68, no.9, 4390-4398.

Vincent A. Fischetti, Richard P. Novick, Joseph J. Ferretti, Daniel A. Portnoy, and Julian I. Rood. "Gram-Positive Pathogens." 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology press, 2006

Watnick, P. I and Kolter R. 1999. *Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm*. Mol Microbiol 34, 586-595

Wimpenny JWT, Colasanti R. 1997. *A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automaton models*. FEMS Microbiol Ecol 22, 1-16.

Wrangstadh M, Szewzyk U, Ostling J, Kjellenberg S. 1990. *Starvation specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine Pseudomonas sp*. Appl Environ Microbiol 56, 2065-72

Yoshida, Akihiro and Howard K. Kuramitsu. "Multiple *Streptococcus mutans* Genes Are Involved in Biofilm Formation." American Society for Microbiology, 2002.

Zhang XQ, Bishop PL, Kupferle MJ. 1998. *Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers.* Water Sci Technol 37, 345-348.



LAMPIRAN

Lampiran 1  
DESKRIPTIF STATISTIK

Descriptives

OD Biofilm

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.0000	3	.41933	.037314	.021543	.32664	.51203	.389	.461
.0029	3	.31100	.074746	.043155	.12532	.49668	.228	.373
.0059	3	.23567	.100201	.057851	-.01325	.48458	.143	.342
.0120	3	.15267	.060053	.034671	.00349	.30185	.102	.219
.0230	3	.19400	.058966	.034044	.04752	.34048	.126	.231
.0470	3	.20467	.011930	.006888	.17503	.23430	.191	.213
.0940	3	.18533	.060451	.034901	.03516	.33550	.132	.251
.1880	3	.16267	.017559	.010138	.11905	.20629	.146	.181
.3750	3	.15400	.047286	.027301	.03653	.27147	.120	.208
Total	27	.22437	.097669	.018796	.18573	.26301	.102	.461

Tests of Normality

Konsentrasi Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
.0000	.286	3	.	.931	3	.492
.0029	.277	3	.	.941	3	.531
.0059	.221	3	.	.986	3	.774
.0120	.270	3	.	.949	3	.565
OD Biofilm .0230	.367	3	.	.793	3	.097
.0470	.339	3	.	.850	3	.241
.0940	.247	3	.	.969	3	.661
.1880	.204	3	.	.993	3	.843
.3750	.331	3	.	.866	3	.284

a. Lilliefors Significance Correction

**Test of Homogeneity of Variances**

OD Biofilm

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.760	8	18	.152

**ANOVA**

OD Biofilm

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.187	8	.023	6.915	.000
Within Groups	.061	18	.003		
Total	.248	26			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: OD Biofilm

Tukey HSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.0000	Konsentrasi Ekstrak	.108333	.047488	.400	-.05806	.27472
	.0029	.183667*	.047488	.024	.01728	.35006
	.0059	.266667*	.047488	.001	.10028	.43306
	.0120	.225333*	.047488	.004	.05894	.39172
	.0230	.214667*	.047488	.006	.04828	.38106
	.0470	.234000*	.047488	.003	.06761	.40039
	.0940	.256667*	.047488	.001	.09028	.42306
	.1880	.265333*	.047488	.001	.09894	.43172
.0029	.3750	-.108333	.047488	.400	-.27472	.05806
	.0000	.075333	.047488	.800	-.09106	.24172
	.0059	.158333	.047488	.069	-.00806	.32472
	.0120	.117000	.047488	.310	-.04939	.28339
	.0230	.106333	.047488	.423	-.06006	.27272
	.0470	.125667	.047488	.234	-.04072	.29206
	.0940	.148333	.047488	.103	-.01806	.31472
	.1880	.157000	.047488	.073	-.00939	.32339
.0059	.0000	-.183667*	.047488	.024	-.35006	-.01728



	.0029	-.075333	.047488	.800	-.24172	.09106
	.0120	.083000	.047488	.712	-.08339	.24939
	.0230	.041667	.047488	.992	-.12472	.20806
	.0470	.031000	.047488	.999	-.13539	.19739
	.0940	.050333	.047488	.973	-.11606	.21672
	.1880	.073000	.047488	.824	-.09339	.23939
	.3750	.081667	.047488	.728	-.08472	.24806
.0120	.0000	-.266667*	.047488	.001	-.43306	-.10028
	.0029	-.158333	.047488	.069	-.32472	.00806
	.0059	-.083000	.047488	.712	-.24939	.08339
	.0230	-.041333	.047488	.992	-.20772	.12506
	.0470	-.052000	.047488	.968	-.21839	.11439
	.0940	-.032667	.047488	.998	-.19906	.13372
	.1880	-.010000	.047488	1.000	-.17639	.15639
	.3750	-.001333	.047488	1.000	-.16772	.16506
.0230	.0000	-.225333*	.047488	.004	-.39172	-.05894
	.0029	-.117000	.047488	.310	-.28339	.04939
	.0059	-.041667	.047488	.992	-.20806	.12472
	.0120	.041333	.047488	.992	-.12506	.20772
	.0470	-.010667	.047488	1.000	-.17706	.15572
	.0940	.008667	.047488	1.000	-.15772	.17506
	.1880	.031333	.047488	.999	-.13506	.19772
	.3750	.040000	.047488	.994	-.12639	.20639
.0470	.0000	-.214667*	.047488	.006	-.38106	-.04828
	.0029	-.106333	.047488	.423	-.27272	.06006
	.0059	-.031000	.047488	.999	-.19739	.13539
	.0120	.052000	.047488	.968	-.11439	.21839
	.0230	.010667	.047488	1.000	-.15572	.17706
	.0940	.019333	.047488	1.000	-.14706	.18572
	.1880	.042000	.047488	.991	-.12439	.20839
	.3750	.050667	.047488	.972	-.11572	.21706
.0940	.0000	-.234000*	.047488	.003	-.40039	-.06761
	.0029	-.125667	.047488	.234	-.29206	.04072
	.0059	-.050333	.047488	.973	-.21672	.11606
	.0120	.032667	.047488	.998	-.13372	.19906
	.0230	-.008667	.047488	1.000	-.17506	.15772
	.0470	-.019333	.047488	1.000	-.18572	.14706
	.1880	.022667	.047488	1.000	-.14372	.18906
	.3750	.031333	.047488	.999	-.13506	.19772
.1880	.0000	-.256667*	.047488	.001	-.42306	-.09028

.0029	-.148333	.047488	.103	-.31472	.01806
.0059	-.073000	.047488	.824	-.23939	.09339
.0120	.010000	.047488	1.000	-.15639	.17639
.0230	-.031333	.047488	.999	-.19772	.13506
.0470	-.042000	.047488	.991	-.20839	.12439
.0940	-.022667	.047488	1.000	-.18906	.14372
.3750	.008667	.047488	1.000	-.15772	.17506
.0000	-.265333*	.047488	.001	-.43172	-.09894
.0029	-.157000	.047488	.073	-.32339	.00939
.0059	-.081667	.047488	.728	-.24806	.08472
.0120	.001333	.047488	1.000	-.16506	.16772
.0230	-.040000	.047488	.994	-.20639	.12639
.0470	-.050667	.047488	.972	-.21706	.11572
.0940	-.031333	.047488	.999	-.19772	.13506
.1880	-.008667	.047488	1.000	-.17506	.15772

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### Homogeneous Subsets

#### OD Biofilm

Tukey HSD

Konsentrasi Ekstrak	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
.0120	3	.15267	
.3750	3	.15400	
.1880	3	.16267	
.0940	3	.18533	
.0230	3	.19400	
.0470	3	.20467	
.0059	3	.23567	
.0029	3	.31100	.31100
.0000	3		.41933
Sig.		.069	.400

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Correlations

		Konsentrasi Ekstrak	OD Biofilm
Konsentrasi Ekstrak	Pearson Correlation	1	-.430*
	Sig. (2-tailed)		.025
	N	27	27
OD Biofilm	Pearson Correlation	-.430*	1
	Sig. (2-tailed)	.025	
	N	27	27

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



## Lampiran 2

### PERHITUNGAN EKSTRAK SECARA MATEMATIS

Untuk mendapatkan ekstrak sebesar  $1.88 \times 10^{-2}$  g/mL;  $9.38 \times 10^{-3}$  g/mL;  $4.69 \times 10^{-3}$  g/mL;  $2.34 \times 10^{-3}$  g/mL;  $1.17 \times 10^{-3}$  g/mL;  $5.86 \times 10^{-4}$  g/mL;  $2.93 \times 10^{-4}$  g/mL;  $1.46 \times 10^{-4}$  g/mL, pertama kali dilakukan pembuatan ekstrak dengan satuan persen (%) yaitu 0,375%; 0,188%; 0.094%; 0,047%; 0,023%; 0,012%; 0,0059%; 0,0029%, kemudian dapat dilakukan dengan menggunakan rumus pengenceran ini.

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

- Berat awal ekstrak daun Seledri konsentrasi 100% = 100 gram
- Untuk mendapat konsentrasi 50% =  
1 mL ekstrak 100% + 1 mL aquades  $\rightarrow$  50 g/mL
- Untuk mendapatkan konsentrasi 10% =  
 $x \times 50 = 1 \times 10 \rightarrow 0.2$  mL ekstrak + 0.8 mL aquades
- a. Untuk konsentrasi 0.375%  $\rightarrow x \times 10 = 1 \times 0.375$   
 $x = 0.0375$  mL ekstrak + 0.9625 aquades  $\rightarrow 1.88 \times 10^{-2}$  g/mL
- b. Untuk konsentrasi 0.188%  $\rightarrow x \times 10 = 1 \times 0.188$   
 $x = 0.0188$  mL ekstrak + 0.9812 aquades  $\rightarrow 9.38 \times 10^{-3}$  g/mL
- c. Untuk konsentrasi 0.094%  $\rightarrow x \times 10 = 1 \times 0.094$   
 $x = 0.0094$  mL ekstrak + 0.9906 aquades  $\rightarrow 4.69 \times 10^{-3}$  g/mL
- d. Untuk konsentrasi 0.047%  $\rightarrow x \times 10 = 1 \times 0.047$   
 $x = 0.0047$  mL ekstrak + 0.9953 aquades  $\rightarrow 2.34 \times 10^{-3}$  g/mL

e. Untuk konsentrasi 0.023%  $\rightarrow x \times 10 = 1 \times 0.023$

$$x = 0.0023 \text{ mL ekstrak} + 0.9977 \text{ aquades} \rightarrow 1.17 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$$

f. Untuk konsentrasi 0.012%  $\rightarrow x \times 10 = 1 \times 0.012$

$$x = 0.0012 \text{ mL ekstrak} + 0.9988 \text{ aquades} \rightarrow 5.86 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$$

g. Untuk konsentrasi 0.0059%  $\rightarrow x \times 10 = 1 \times 0.0059$

$$x = 0.00059 \text{ mL ekstrak} + 0.99941 \text{ aquades} \rightarrow 2.93 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$$

h. Untuk konsentrasi 0.0029%  $\rightarrow x \times 10 = 1 \times 0.0029$

$$x = 0.00029 \text{ mL ekstrak} + 0.99971 \text{ aquades} \rightarrow 1.46 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$$

