

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kismis

2.1.1 Definisi Kismis

Kismis adalah anggur hitam yang berbentuk kecil-kecil dan dikeringkan. Anggur hitam kecil yang biasa dibuat kismis tersebut pada mulanya berasal dari Yunani. Pada saat ini terdapat beberapa varietas anggur yang dapat dibuat kismis yaitu: yang berukuran kecil, berwarna biru kehitaman, enak dan tidak berbiji. Mutu kismis yang baik harus tebal bundar, berisi (berdaging) dan bersih, ukurannya seragam dan berwarna biru kehitaman. Kismis tidak boleh mengandung buah yang mengkerut, berdaging sedikit atau tidak berdaging, berwarna merah yang menyebabkan terlalu asam dan dapat merusak rasa kue (Koswara, 2006).

Ada empat macam metode pembuatan kismis yaitu: metode alami, dehidrasi, *continuous tray*, dan metode pengeringan di pohon. Proses pengeringan dilakukan hingga mencapai kadar air 15-18 g dan kadar gula 68-70 g per 100 gram kismis. Kismis yang baik memiliki warna coklat kehitaman atau keemasan (Carughi, 2008; Koswara, 2006).

Kismis sangat manis karena memiliki konsentrasi gula yang tinggi, dan jika disimpan lama maka gula tersebut akan terkristalisasi di dalamnya. Proses ini dapat membuat kismis menjadi lebih berkerut dan kasar, walaupun tidak berpengaruh pada penggunaannya. Dekristalisasi dapat dilakukan dengan

merendam kismis dalam cairan (alkohol, sari buah, atau air mendidih) agar gula dalam kismis larut (Koswara, 2006).



Gambar 2.1. Kismis *Thompson Seedless* (Anonim, 2008)

2.1.2 Jenis kismis

Kismis (raisin) dibuat dengan cara mengeringkan buah anggur tidak berbiji, terutama dari jenis *Vinifera*, seperti *Thompson Seedless*. Anggur jenis tersebut selain tidak berbiji, juga memiliki kulit tipis, serta aroma dan rasa yang sangat manis. Buah tersebut mudah dikeringkan, serta tidak perlu ditambahkan gula sebagai pengawet. Di California, 95 persen kismis dibuat dari anggur jenis tersebut (Carughi, 2008). Belakangan kismis juga tersedia dalam berbagai macam merek dan kualitas. Jenis kismis yang baik berasal dari Yunani dan negara-negara Mediterania lainnya, juga dari Australia. Beberapa jenis kismis terbaik dikenal di pasaran dengan nama atau merek *Vostizzas*. Jenis atau merek lain yang sangat baik adalah *Gulf*, *Patras*, *Pyrgos*, *Amelia* dan cap “*Crown*” yang berasal dari Australia. Kismis merek *Vostizzas* biasanya berharga paling mahal (Koswara, 2006).



Gambar 2.2. Kismis Sultana (Anonim, 2008)

Varietas kismis tergantung juga dari jenis anggur dan cara pengolahan yang digunakan. “Golden Kismis” dibuat dari anggur jenis Thompson, dan diolah menggunakan Sulfur Dioksida (SO_2). Sedangkan Varietas “Flame” dikeringkan untuk mendapatkan warna seperti api. Jenis lain yaitu “Zante Currants” merupakan kismis yang berbentuk lebih kecil dari kismis biasanya dan mempunyai rasa asam (Carughi, 2008). Selain perbedaan varietas, kismis sendiri mempunyai warna yang beragam (hijau, hitam, biru, merah, kuning, ungu), serta ukuran yang berbeda-beda pula (Koswara, 2006).

2.1.3 Kandungan Gizi Kismis

Sebagai bahan pangan, kismis kaya akan gula, kandungan asam sedang dan tinggi kandungan kaliumnya. Komposisi kismis yang dibuat dari anggur varietas Thompson Seedless adalah sebagai berikut : Total padatan 83 %, air 17%, gula (total sebagian gula invert) 70,2 %, abu 2,1%, total asam (sebagai asam tartarat) 2,12%, karbohidrat 77,2 %, protein 2,77 %, serat kasar 0,97 %, lemak 0,50% dan banyak mengandung mineral seperti natrium, kalium, kalsium, magnesium, fosfat, besi, tembaga dan seng. Vitamin yang terkandung dalam kismis antara lain vitamin B₆, niasin, riboflavin, asam pantetonat, tiamin dan biotin

(Koswara, 2006). Kandungan gizi kismis menurut USDA nutrient database dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2.1. Kandungan Gizi Kismis per 100 gram (USDA *nutrient database*, 2008)

No.	Zat Gizi	Kandungan
1.	Kalori	300 kcal/ 1388 kJ
2.	Karbohidrat	79 gram
3.	Gula	59 gram
4.	Dietary fiber	4 gram
5.	Lemak	0.5 gram
6.	Kalsium	50 gram
7.	Protein	3 gram
8.	Besi	1,9 mg
9.	Sodium	11 mg
10.	Potassium	750 mg

Anggapan masyarakat tentang makanan yang bersifat manis dan lengket pada gigi itu merugikan, tidaklah selalu benar. Walaupun kismis memiliki kandungan gula dan lengket ternyata mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang mengganggu di rongga mulut. Gula yang ada di dalam kismis kebanyakan adalah fruktosa bukan sukrosa, sehingga tidak dapat dipecah menjadi glukosa. Bahkan kismis juga mengandung fitokimia yang menguntungkan bagi kesehatan tubuh terutama gigi dan gusi. Selain itu fitokimia dalam kismis sangat bermanfaat untuk melawan bakteri penyebab karies dan penyakit gusi (Carughi, 2008; Wu *et al*, 2009).

Kandungan fitokimia yang diidentifikasi dapat menghambat pertumbuhan bakteri penyebab karies adalah asam *oleanolic* dan asam *ursolic*, *oleanolic aldehyd*, *betulin*, *betulinic acid*, dan *5 (hidroxymethyl)-2-furfural*. Selain beberapa bahan tersebut dalam kismis juga ditemukan berbagai jenis

antioksidan seperti senyawa fenol dalam bentuk *Condensed Tannin* yaitu *catechin* dan *epicatechin*, serta flavonoid dalam jumlah kecil, karena mudah rusak dan hancur oleh proses pemasakan. Zat yang dianggap mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* adalah asam *oleanolic* dan asam *ursolic*. Zat ini dapat menghambat perlekatan bakteri sehingga bakteri tidak mendapat makanan dan pertumbuhannya terhambat (Breksa *et al*, 2010; Rivero-Cruz *et al*, 2008; Wu *et al*, 2009).

2.2 Bahan Aktif di dalam kismis

Dalam kismis terdapat beberapa bahan aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri seperti fenol (dalam bentuk tannin dan flavonoid) dan triterpenoid dalam bentuk asam *Oleanolic* dan asam *Ursolic* (Breksa *et al*, 2010; Rivero-Cruz *et al*, 2008; Wu *et al*, 2009).

2.2.1 Fenol

Fenol atau asam karbolat adalah zat kristal tak berwarna yang memiliki bau khas. Rumus kimia fenol adalah C_6H_5OH . Berbentuk kristal pada suhu ruangan. Strukturnya terdiri dari gugus hidroksil yang berikatan dengan cincin fenil. Fenol merupakan komponen utama pada antiseptik dagang yaitu Triklorofenol yang lebih dikenal dengan sebutan *TCP*. Fenol juga terdapat dalam beberapa obat-obatan seperti anastesi dan penghilang rasa sakit (Santoso, 2010).

Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan. Ciri-cirinya adalah mempunyai dua gugus hidroksil. Salah satu golongan terbesar fenol adalah flavonoid, dan beberapa golongan bahan polimer lainnya antara lain tannin, lignin, dan melanin (Santoso, 2010).

Beberapa senyawa fenol diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa turunan fenol seperti asam caffeic diketahui dapat berfungsi sebagai antibakteri, antivirus, dan anti jamur. Beberapa peneliti telah membuktikan bahwa makin banyaknya gugus hidroxil maka toksisitas senyawa fenol terhadap bakteri makin meningkat, sedangkan makin tinggi tingkat oksidasi dari senyawa fenol tersebut maka senyawa itu lebih bersifat menghambat (Cowan, 1999).

Mekanisme yang dianggap menyebabkan senyawa fenol mempunyai efek toksik terhadap bakteri adalah terhambatnya enzim oleh bahan fenol yang teroksidasi. Pada konsentrasi rendah fenol bekerja dengan merusak membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran sel, sedangkan pada konsentrasi tinggi fenol berkoagulasi dengan protein seluler. Aktivitas ini sangat efektif ketika bakteri dalam tahap pembelahan. Ketika fenol dengan mudah dapat berpenetrasi ke dalam sel (Cowan, 1999).

2.2.2 Tannin

Tannin adalah *polyphenol* yang larut dalam air dan banyak ditemukan pada tanaman herba dan tumbuhan berkayu (Akiyama *et al*, 2001). Berat molekular senyawa ini berkisar antara 500 sampai 3000 dan senyawa ini dapat ditemukan hampir di setiap bagian dari tumbuhan. Senyawa ini mempunyai dua golongan yaitu *hydrolysable* dan *non-hydrolysable (condensed)*. *Hydrolysable tannins* biasanya berbasis pada asam gallic biasanya terdiri dari ester berganda dan gugusan *D-glucose*. *Condensed tannin* yang paling banyak tersedia dan biasanya disebut *Proanthocyanidins* adalah turunan dari monomer flavonoid (Cowan, 1999).

Belakangan zat ini menjadi bahan pembicaraan karena dipercaya dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit. Tannin juga mempunyai efek antimikroba terhadap berbagai macam bakteri dan jamur. Tannin mempunyai beberapa mekanisme anti mikroba yaitu: astrigent dari tannin mampu menghambat beberapa enzim yang dihasilkan atau dibutuhkan oleh mikroba, toksisitas tannin mungkin dipengaruhi oleh aksinya pada membran mikroba, kompleksasi ion besi dari tannin juga dipercaya mempengaruhi toksisitasnya pada mikroba. Zat tannin yang terdapat dalam ekstrak kismis adalah gallic acid (Breksa *et al*, 2010)

2.2.3 Flavonoid

Flavonoid adalah struktur kimia yang termasuk dalam senyawa *hydroxylated phenol* tetapi muncul sebagai unit senyawa C6-C3 yang terhubung dengan cincin aromatik. Senyawa ini merupakan senyawa yang banyak dikeluarkan oleh tanaman sebagai respon saat tanaman tersebut diinfeksi oleh mikroba. Maka tidak mengherankan jika flavonoid efektif sebagai antimikroba spektrum luas pada penelitian-penelitian *in-vitro* (Cowan, 1999; Cushnie *et al*, 2006).

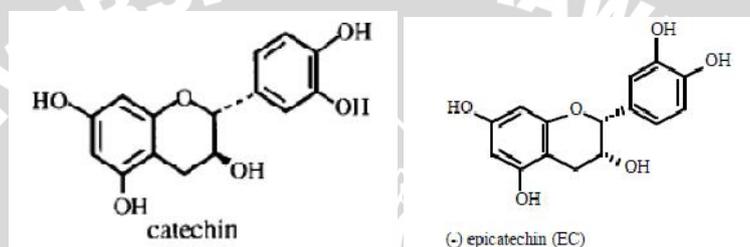
Mekanisme antimikroba pada flavonoid mungkin berhubungan dengan kemampuannya untuk menempel dan bersatu dengan dinding sel dari bakteri. Flavonoid lipofilik juga dapat mengganggu membran pada bakteri (Cowan, 1999).

Pada anggur senyawa flavonoid yang ditemukan adalah senyawa catechin dan turunannya.

2.2.3.1 Catechin

Zat ini dan derivatnya seperti epicatechin merupakan senyawa flavonoid yang banyak dibicarakan akhir-akhir ini karena dipercaya dapat membunuh

bakteri. Zat yang banyak terdapat di teh ini merupakan turunan paling akhir dari flavonoid C₃. Zat ini mempunyai sifat antimikroba terhadap *S. mutans* adalah dengan menghambat proses GFT (*glucosyltransferase*) (Cowan, 1999). Catechin juga dapat bergabung dengan peptidoglycan pada dinding sel bakteri dan menginduksi presipitasi pada bakteri. Hal ini menyebabkan rusaknya dinding sel dan terganggunya biosintesis dari bakteri (Shimamura *et al*, 2007). Senyawa catechin yang ada pada kismis adalah senyawa catechin dan epicatechin.

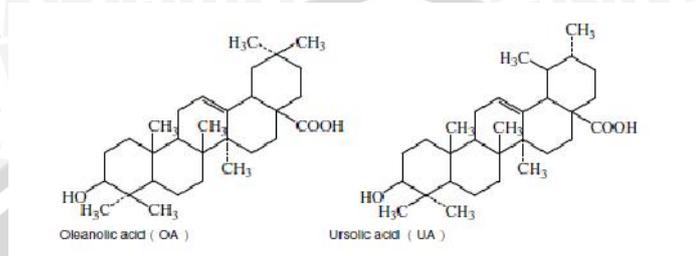


Gambar 2.3 Struktur kimia catechin dan epicatechin

2.2.4 Asam *Oleanolic* dan Asam *Ursolic*

Asam *oleanolic* dan asam *ursolic* merupakan zat fitokimia yang paling banyak ditemukan dalam kismis. Asam *oleanolic* dan asam *ursolic* merupakan salah satu derivat dari zat yang disebut triterpenoid. Asam *oleanolic* dan asam *ursolic* telah diidentifikasi sebagai *aglycone* dari banyak triterpenoid saponin pada tanaman obat-obatan, sebagai komponen aktif tanaman yang membantu terjadinya efek farmakologis maupun biologis. Efek farmakologis dari Asam *Oleanolic* dan Asam *Ursolic* antara lain adalah : anti inflamasi, anti virus, anti mikroba, anti diare. Di China zat ini telah dipasarkan sebagai obat dari kerusakan hati (Bai *et al*, 2007). Dalam hubungannya dengan *S. mutans*, asam *oleanolic* dan asam *ursolic* ini berfungsi menghambat proses GFT (*glucosyltransferase*), yaitu proses perubahan dari glukosa menjadi sukrosa dan fruktosa sehingga proses pembentukan *insoluble glucan*-pun terganggu (ISG)

(Rivero-Cruz *et al*, 2008). Hal ini menyebabkan pembentukan plak menjadi terhambat sehingga bakteri tidak mendapatkan cukup energi untuk bertahan hidup.



Gambar 2.4 Struktur Kimia Asam *Oleanolic* dan Asam *Ursolic*

2.3 Metode Penyarian Bahan Aktif Dari Bahan Alam

Penyarian atau ekstraksi merupakan istilah farmasi yang melibatkan proses pemisahan bagian tumbuhan atau bagian dari hewan yang aktif dan mempunyai kegunaan medis dari bagian yang tidak aktif menggunakan pelarut yang selektif serta metode ekstraksi yang standar. Tujuan dari terstandarisasinya metode ekstraksi adalah untuk mempertahankan dan mendapatkan bahan aktif yang mempunyai kegunaan medis dan menghilangkan material inert dengan pelarut selektif yang disebut *menstruum*. Ekstrak yang dihasilkan lalu dapat digunakan sebagai obat dalam bentuk cair atau dapat digunakan dalam dosis tertentu dengan menjadikannya sebagai sediaan kapsul atau tablet (Handa, 2008).

Tehnik yang umum digunakan dalam ekstraksi tanaman obat antara lain adalah maserasi, infusi, perkolasi, digesti, dekoksi, sokhletasi, ekstraksi *counter current*, ekstraksi menggunakan gelombang mikro, ekstraksi menggunakan suara ultrasonik (sonikasi), ekstraksi *supercritical fluid*, ekstraksi *phytonic* (Tiwari *et al*, 2011; Handa, 2008).

2.3.1 Pemilihan Pelarut

Kesuksesan penyarian bahan yang aktif secara biologis dari tanaman medis tergantung pada jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Sifat pelarut yang baik untuk ekstraksi tanaman meliputi, toksisitas yang rendah, mudah ter-evaporasi pada suhu rendah, promosi penyerapan fisiologis yang cepat dari ekstrak, awet dan dapat mengawetkan, tidak menyebabkan ekstrak pecah. Faktor-faktor yang mempengaruhi pilihan pelarut adalah jumlah fitokimia yang akan diekstraksi, laju ekstraksi, keragaman dari senyawa akan diekstrak, keragaman senyawa penghambat yang terekstrak, kemudahan dalam penanganan dari ekstrak, toksisitas pelarut dalam proses *bioassay*, potensi bahaya dari ekstrak. Pemilihan pelarut dipengaruhi juga oleh tujuan yang diinginkan dari ekstrak tersebut. Karena sisa pelarut akan ditemukan pada hasil akhir ekstraksi maka pelarut harus tidak beracun dan tidak mengganggu *bioassay*. Pilihan pelarut juga bergantung pada target yang akan diekstraksi (Tiwari *et al*, 2011; Handa, 2008).

Macam - macam pelarut yang digunakan dalam ekstraksi :

a. Air

Air merupakan pelarut universal. Walaupun para penyembuh tradisional menggunakan air sebagai pelarut utama tetapi ekstrak tanaman yang menggunakan pelarut organik memberikan efek antimikroba yang lebih konsisten dibandingkan ekstrak yang menggunakan pelarut air.

b. Aseton

Aseton melarutkan sebagian besar komponen hidrofilik dan lipofilik serta larut dalam air, stabil dan memiliki toksisitas rendah.

c. Alkohol

Aktifitas pelarut alkohol lebih tinggi dari air hal ini didapatkan dari lebih banyaknya polifenol yang ikut pada alkohol. Hal ini juga membuktikan bahwa alkohol lebih efektif di dinding sel dan degradasi biji yang mempunyai sifat nonpolar hal ini yang menyebabkan polifenol lebih mudah ditarik. Alkohol terutama etanol dapat mempenetrasi membran dari tumbuhan lebih mudah sehingga lebih banyak menarik zat aktif dalam tumbuhan

d. Chloroform

e. Ether

Ether biasanya digunakan dalam ekstraksi coumarin dan asam lemak.

Tabel 2.2 Daftar Senyawa Yang Dapat Diekstrak Oleh Pelarut (Tiwari *et al*, 2011)

Air	Ethanol	Methanol	Chloroform	Ether	Acetone
Antosianin	Tannin	Antosianin	Terpenoid	Alkaloid	Fenol
Starches	Polifenol	Terpenoid	Flavonoid	Terpenoid	Flavonol
Tannin	Poliasetilen	Saponin		Coumarine	
Saponin	Flavonol	Tannin			
Terpenoid	Terpenoid	Xantoxiline			
Polipeptida	Sterol	Totalor			
Lectin	Alkaloid	Quasinoid			
		Lactone			
		Flavon			
		Phenon			
		Polifenol			

2.3.2 Metode Penyarian (Ekstraksi)

Variasi dari metode ekstraksi biasanya berdasarkan oleh (Tiwari *et al*, 2011; Handa, 2008) :

- a. Lamanya masa ekstraksi
- b. Pelarut yang digunakan
- c. pH pelarut
- d. Temperatur
- e. Ukuran partikel dari sampel
- f. Rasio antara pelarut dengan sampel

Prinsip dasar dari ekstraksi adalah dengan menggiling sampel baik saat basah ataupun kering supaya luas permukaan sampel yang terekstraksi lebih luas sehingga laju ekstraksi bertambah. Pada studi yang telah dilakukan disebutkan bahwa rasio antara pelarut dan sampel yang ideal adalah 10:1 (v/w) dalam catatan sampel yang digunakan adalah sampel kering.

2.3.2.1 Macam Dan Prosedur Ekstraksi

- a. Homogenisasi Jaringan tumbuhan

Bagian dari tanaman kering ataupun basah di blender sehingga membentuk partikel halus lalu masukan ke dalam pelarut dan dikocok dengan kuat selama 5 sampai 10 menit lalu dibiarkan selama 24 jam dan disaring.

- b. Ekstraksi Serial Lengkap

Ini adalah metode umum ekstraksi yang melibatkan ekstraksi berturut-turut menggunakan berbagai pelarut dimulai dengan pelarut non polar (heksana) menuju ke pelarut polar (metanol) untuk memastikan bahwa berbagai macam senyawa dengan berbagai macam polaritas dapat diekstraksi. Beberapa peneliti menggunakan ekstraksi sokhlet menggunakan bahan tanaman kering dengan

pelarut organik. Metode ini tidak dapat digunakan untuk senyawa termolabil karena pemanasan berkepanjangan dapat menyebabkan degradasi senyawa

c. Ekstraksi Sokhlet

Ekstraksi Sokhlet dapat digunakan jika senyawa yang ingin diekstraksi mempunyai tingkat kelarutan yang terbatas terhadap pelarut. Keuntungan dari sistem ini adalah hanya sebagian kecil dari pelarut yang melewati sampel sehingga lebih ekonomis.

d. Maserasi

Dalam maserasi seluruh bubuk kasar dari sampel dibiarkan tetap berkontak dengan pelarut dalam wadah yang tertutup dalam periode tertentu sampai senyawa yang diinginkan terlarut. Metode ini sangat cocok digunakan untuk mengekstrak bahan- bahan yang termolabil.

e. Dekoksi

Metode ini digunakan untuk mengekstrak senyawa yang larut dalam air dan tahan panas dengan merebus bahan yang akan diekstrak selama 15 menit, didinginkan, serta melewatkan pelarut dingin ke bahan sampai mencapai volume yang diinginkan.

f. Infusi

Infusum segar diperoleh dengan memaserasi bahan padat dengan air dingin ataupun air mendidih.

g. Digesti

Merupakan maserasi dengan pengaplikasian suhu hangat. Hal ini dilakukan ketika suhu yang tinggi dapat merusak senyawa yang diinginkan.

h. Perkolasi

Ini adalah prosedur yang paling banyak dilakukan dalam pembuatan *tincture* atau ekstrak cairan. Biasanya menggunakan alat bernama perkolator. Bahan padat dibasahi menggunakan menstrum yang tepat dan didiamkan selama kurang lebih 4 jam dalam wadah yang tertutup dengan baik, setelah itu massa disatukan dan tutup perkolator bagian atas ditutup. Menstrum tambahan ditambahkan agar terbentuk lapisan di bawah massa, setelah itu massa dibiarkan ter maserasi di dalam perkolator selama 24 jam.

Outlet perkolator kemudian dibuka dan cairan hasil ekstraksi dibiarkan menetes perlahan-lahan. Menstrum tambahan ditambahkan sampai volume cairan yang keluar mencapai $\frac{3}{4}$ dari volume yang diinginkan. Kemudian *marc* ditekan lalu hasil yang keluar setelah tertekan ditambahkan ke hasil perkolasi yang pertama keluar. Menstrum lalu ditambahkan sampai mencapai volume yang seharusnya.

i. Sonikasi

Prosedur ini melibatkan penggunaan gelombang suara ultra sonik yang frekuensinya dimulai dari 20 kHz sampai dengan 2000 kHz. Hal ini meningkatkan permeabilitas dinding sel dan menghasilkan kavitasi. Meskipun proses ini berguna dalam beberapa kasus, seperti ekstraksi akar *rauwolfi*, tetapi pemanfaatannya secara skala besar terbatas karena biaya yang terlalu tinggi. Salah satu kerugian dari proses ini adalah terbentuknya radikal bebas dan berubahnya molekul dari obat

2.4 Karies Gigi

2.4.1 Definisi Karies Gigi

Karies dental adalah istilah yang digunakan untuk mendeskripsikan hasil dari larutnya permukaan gigi secara lokal yang disebabkan oleh kejadian metabolis yang terjadi di *biofilm/dental plaque* yang menutupi sebagian area. Karies dental merupakan penyakit gigi dan mulut yang tersebar disetiap tempat di dunia, dan merupakan faktor kunci yang bertanggung jawab terhadap terjadinya sakit dental dan kehilangan gigi (Fejerskov and Kidd, 2003).

2.4.2 Etiologi karies gigi

Karies gigi merupakan proses yang dipengaruhi oleh banyak faktor, tetapi faktor utama yang dapat menyebabkan karies ada 4 yaitu:

2.4.2.1 Biofilm atau *Dental Plaque*

Dental plaque adalah kumpulan dari bakteri dan produk-produk yang dihasilkannya yang melekat pada semua permukaan gigi. *Dental plaque* disebut juga sebagai biofilm yaitu suatu komunitas mikroorganisme yang melekat pada suatu permukaan. *Dental plaque* terbentuk tiap hari terlepas ada tidaknya konsumsi makanan (Kidd, 2005). Tahap-tahap pembentukan *dental plaque* adalah sebagai berikut :

- a. Pembentukan *pellicle* yaitu suatu lapisan aselular yang sarat protein dan terbentuk dari saliva pada permukaan gigi
- b. Setelah 4 jam maka akan ada bakteri yang berkoloni dalam *pellicle* tersebut.

Bakteri pada tahap ini kebanyakan adalah bakteri *Streptococcus* (*S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*) namun hanya 2 % dari bakteri tersebut adalah *S. mutans*.

- c. Dalam 4 sampai 24 jam bakteri yang menempel akan bertumbuh, yang menyebabkan timbulnya mikrokoloni bakteri yang berbeda-beda.
- d. Dalam 1 sampai 14 hari koloni *Streptococcus* digantikan oleh koloni dari bakteri *Actinomyces*. Pergantian koloni ini disebut juga sebagai Suksesasi Mikrobial. Bakterinya semakin beragam dan mikrokoloni tetap tumbuh.
- e. Dalam waktu 2 minggu plak dianggap sudah matang tetapi terdapat variasi lokal di setiap tempat di mana plak tersebut tumbuh. Variasi lokal inilah yang menjelaskan mengapa lesi dapat terjadi di suatu tempat tetapi di tempat lain tidak walaupun dalam satu mulut.

2.4.2.2 Saliva

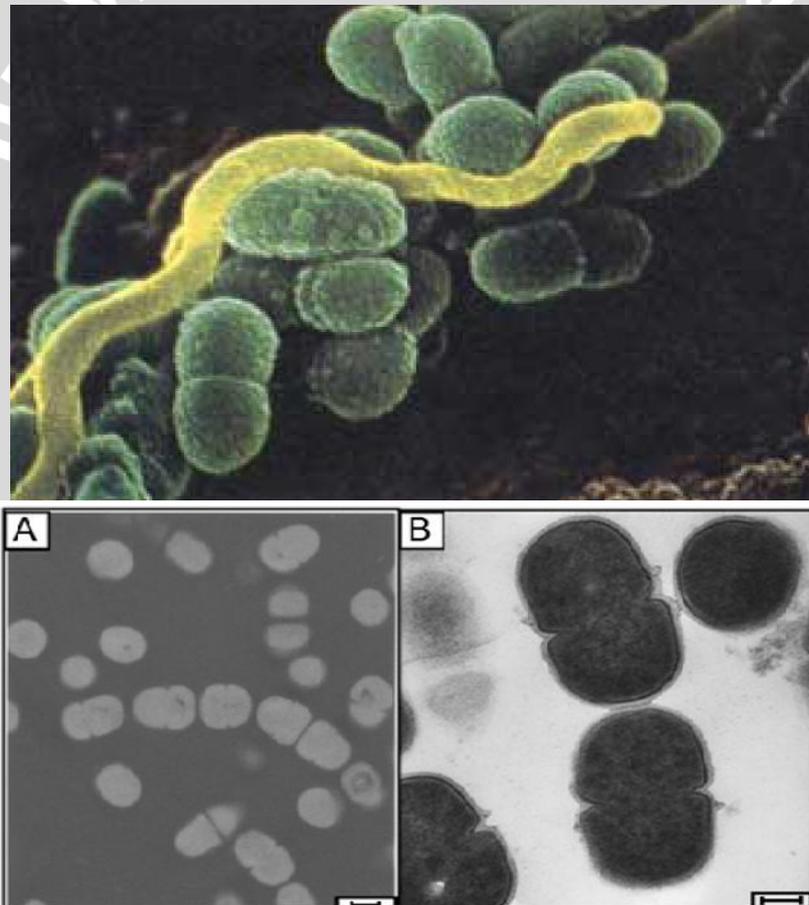
Dalam keadaan normal gigi akan dibasahi oleh lapisan saliva. Saliva tersaturasi oleh ion kalsium dan fosfat yang berguna dalam proses remineralisasi dari lesi awal karies gigi. Saat aliran saliva menurun atau tidak ada akan terjadi peningkatan retensi makanan. Karena aliran saliva berkurang menyebabkan kemampuan buffer saliva juga berkurang sehingga keadaan asam di rongga mulut akan bertahan lebih lama. Hal ini menyebabkan bakteri penghasil asam terus menghasilkan asam dan bermetabolisme terus-menerus. Hal ini yang menyebabkan terjadinya karies gigi yang tidak terkontrol (Kidd, 2005).

2.4.2.3 Bakteri : *Streptococcus mutans*

S. mutans adalah agen utama karies, walaupun banyak bakteri lain yang terdapat pada *dental plaque*. Organisme ini tidak hanya asidogenik (menghasilkan asam) tetapi juga asidurik (dapat hidup dalam kondisi yang sangat asam). Bakteri ini mampu menghasilkan suatu polisakarida yang lengket yang disebut dekstran berkat adanya sukrosa. Dekstran membantu perlekatan dari organisme ke enamel dan perlekatan antar organisme. Bakteri ini juga

merupakan agen penting dari penyakit endocarditis, dimana 60% dari kasus endocarditis disebabkan bakteri ini (Samaranayake, 2002).

S. mutans merupakan bakteri yang paling banyak ditemui pada lesi karies gigi dan berperan penting pada proses awal terjadinya karies gigi. Mikroba ini pertama kali ditemukan oleh Clarke pada tahun 1924. Clarke memberinya nama *Streptococcus* karena morfologinya yang bervariasi. Nama "mutans" sendiri diberikan karena kemampuannya bertransisi dari bentuk kokus ke bentuk kokobasil (Samaranayake, 2002).



Gambar 2.5. Morfologi *S. mutans* (Nugraha, 2008)

S. mutans merupakan bakteri gram positif, bersifat nonmotil (tidak bergerak), bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk kokus yang sendirian berbentuk bulat atau bulat telur dan tersusun dalam rantai dengan diameter 0,1

sampai 0.7 μm . Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18°-40° Celsius dengan pH 7,4 sampai 7,6. Morfologi koloni *S. mutans* berwarna opak, berdiameter 0,5 sampai 1,0 mm permukaannya kasar (hanya 7% yang licin dan bersifat mukoid). *S. mutans* biasanya ditemukan pada rongga gigi manusia yang luka dan menjadi bakteri yang paling kondusif menyebabkan karies untuk email gigi (Nugraha, 2008).

Pada umumnya *S. mutans* dapat tumbuh dalam media padat seperti agar darah (Brooks *et al*, 2004). Media pertumbuhan *S. mutans* yang lain adalah BHI (*Brain Heart Infusion*) dan *Todd Hewitt Broth* sedangkan media selektif *S. mutans* adalah *Mitis Salivarius Agar* (MSA) yang terdiri dari *Mitis Salivarius with Bacitracyn* (MSB) serta *Mitis Salivarius with Bacitracyn and Kanamycyn* (MSKB) dan Tryptone Yeast Cystine (TYC) (Wan *et al*, 2003). Pertumbuhan *S. mutans* cenderung lambat pada media padat atau media cair kecuali diperkaya dengan cairan darah atau cairan jaringan (Brooks *et al*, 2004).

Secara taksonomi klasifikasi *S. mutans* menurut *National Centre for Biotechnology Information* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Lactobacilalles
Family	: Streptococcaceae
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Species	: <i>S. Mutans</i>

Saat ini ada 7 spesies yang berbeda dari *S. mutans* dan 8 serotipe (a-h) yang diakui berdasarkan sifat antigenik dari dinding sel karbohidratnya. *S. mutans* pada manusia hanya terbatas pada 3 serotipe saja yaitu c, e, dan f (Samaranayake, 2002).

Tabel 2.3. Klasifikasi *Streptococcus* Berdasarkan Serotipe (Samaranayake, 2002)

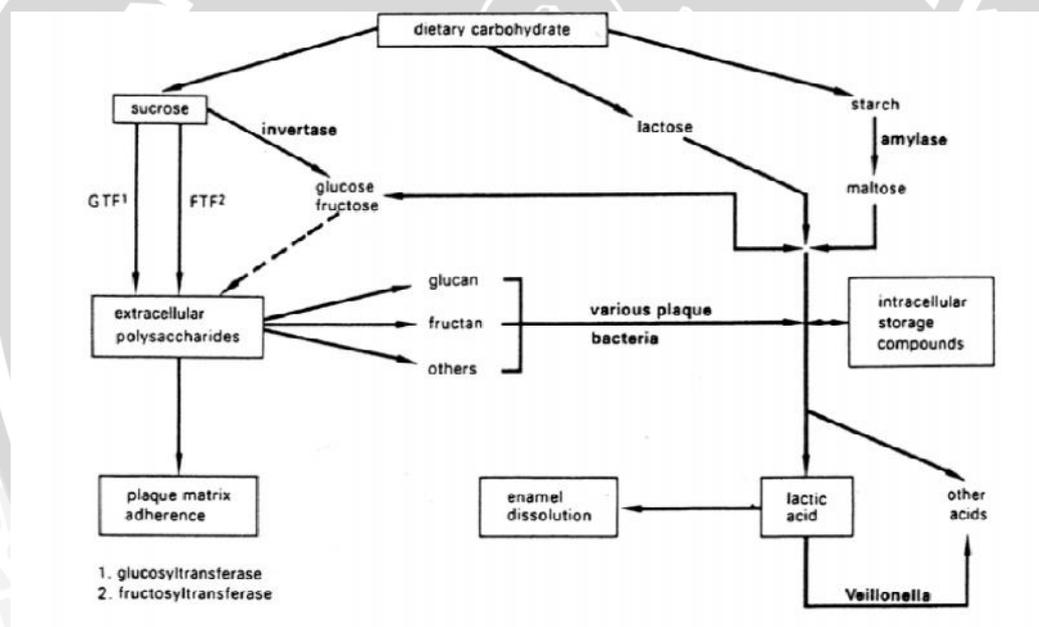
No.	Serotypes	Nama spesies	Hospes
1.	c, e, dan f	<i>S. mutans</i>	Manusia
2.	B	<i>S. rattus</i>	Tikus
3.	A	<i>S. cricetus</i>	Hamster dan manusia
4.	d, g	<i>S. sobrinus</i>	Manusia
5.	C	<i>S. ferus</i>	Tikus liar
6.	E	<i>S. downei</i>	Monyet berekor pendek
7.	H	<i>S. macacae</i>	Monyet berekor pendek

Bakteri *S. mutans* yang biasanya digunakan dalam penelitian ada 2 jenis yaitu:

- Standar Strain* adalah suatu koloni *S. mutans* yang merupakan hasil perkembangbiakan dari *wild strain* yang telah diketahui serotipenya dan dikembangbiakkan di dalam laboratorium.
- Wild Strain* adalah suatu strain *S. mutans* yang diambil dari saliva atau plak pada manusia yang belum diketahui serotipenya.

Secara umum *S. Mutans* dikenal mampu mensintesa polisakarida ekstraseluler dari sukrosa, mengalami agregasi sel ke sel ketika bercampur dengan sukrosa atau dekstran dan dapat berkembang dalam lingkungan yang mengandung antibiotik sulfadimetin dan bacitracin serta menfermentasi manitol dan sorbitol.

Sedangkan secara khusus bakteri ini mempunyai sifat dapat bertahan hidup di lingkungan yang asam dan dapat menghasilkan asam. Bakteri ini dapat membentuk polisakarida ekstraseluler dari sukrosa menggunakan dua enzim yaitu *glucosyltransferase* (GTF) dan *fructosyltransferase* (FTF). Sukrosa adalah disakarida yang terdiri dari satu molekul glukosa dan satu molekul fruktosa. GTF memecah sukrosa, mengikat glukosa dan membentuk Glucan (Dekstran) dengan fermentasi fruktosa. Fruktans (levans) dibentuk melalui *fructosyltransferase* dengan fermentasi bagian dari glukosa. *S. mutans* juga mengumpulkan polisakarida intraseluler (Bowen *and* Koo, 2011)

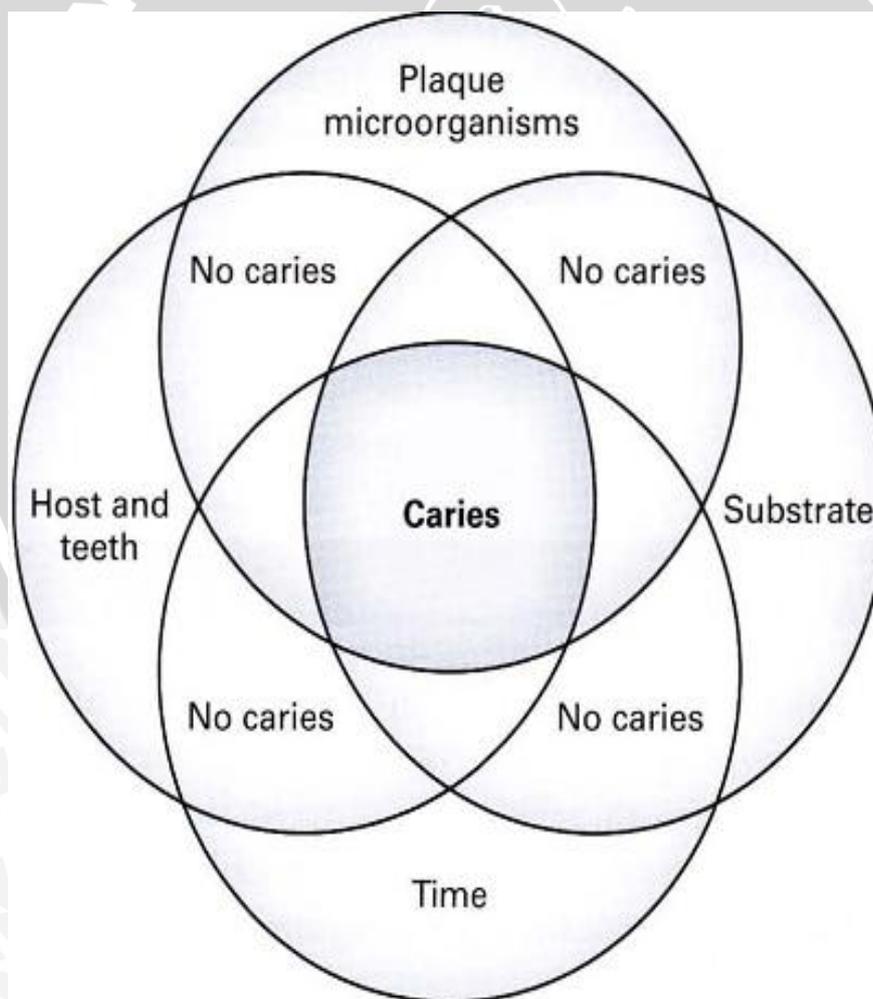


Gambar 2.6. Skema penguraian glukosa (Nugraha, 2008)

2.4.2.4 Asam pada makanan atau minuman

Sumber asam termasuk fermentasi karbohidrat dari makanan oleh bakteri, minuman bersoda, dan jus buah. Jika gigi terpapar oleh makanan ini terus menerus akan terjadi demineralisasi dengan cepat yang dapat mengubah karies ringan menjadi rampan. Bakteri yang terdapat dalam plak akan merubah

glukosa, sukrosa dan fruktosa menjadi asam laktat melalui proses glikolisis yang disebut dengan fermentasi. Bila asam tersebut terpapar dengan gigi akan terjadi proses demineralisasi. Sebaliknya proses demineralisasi bisa dihentikan dengan menaikkan pH dalam mulut menjadi normal. Remineralisasi terjadi jika ada mineral-mineral yang dibutuhkan di dalam rongga mulut. Mineral-mineral tersebut dapat ditemukan dalam saliva, pasta gigi berflourida dan cairan pencuci mulut (Mount *and* Hume, 2005). Karies berlanjut dapat ditahan pada tingkat ini. Apabila proses demineralisasi berlanjut akan terjadi kavitas pada gigi.



Gambar 2.7. Diagram Hubungan Antar Faktor penyebab Utama Karies Gigi (Samaranayake, 2003)

2.5 Antimikroba

Antimikroba dapat diperoleh secara alami, semisintetik, atau sintetik. Antimikroba alamiah adalah bahan metabolit yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme lain, atau yang biasa disebut antibiotika. Antibiotika tersebar di alam bebas dan memegang peranan penting dalam mengatur populasi mikroba di alam bebas. Contoh antibiotika adalah dari genus *Penicillium*, *Bacillus*, *Streptomyces*. Antimikroba semisintetik diperoleh dengan cara melakukan modifikasi rumus kimia dari senyawa alamiah. Tujuan antimikroba semi-sintetik adalah untuk memperluas spektrum, menurunkan toksisitas, meningkatkan stabilitas atau memperbaiki farmakokinetik. Contoh antimikroba semi-sintetik adalah ampisilin dan metisilin. Sedangkan antimikroba sintetik merupakan antimikroba yang dibuat secara kimiawi di laboratorium. Antimikroba sintetik ini biasa disebut kemoterapeutika. Contoh antimikroba sintetik adalah golongan sulfonamid, INH, dan golongan kuinolon (Brooks *et al*, 2004).

Secara umum, sebaiknya bahan antimikroba mempunyai sifat-sifat sebagai berikut (Brooks *et al*, 2004):

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

h. Kadar bakterisidal di dalam tubuh cepat tercapai dan bertahan lama.

Selain itu, faktor-faktor yang mempengaruhi kematian mikroba pada pemberian suatu antimikroba adalah sebagai berikut (Brooks *et al*, 2004) :

a. Jumlah mikroba

Makin banyak jumlah mikroba, makin lama waktu yang diperlukan untuk membunuh mikroba.

b. Bentuk kehidupan mikroba

Bentuk endospora sulit dibunuh dan bentuk vegetatif juga menunjukkan kepekaan yang bervariasi terhadap kontrol fisis maupun khemis.

c. Lingkungan

Bahan organik, misalnya darah, pus, saliva, atau tinja sering menghambat kerja antimikroba khemis maupun fisis.

d. Waktu

Seperti diketahui, reaksi kimia akan berjalan lebih cepat pada suhu yang lebih tinggi. Oleh karena itu, proses pemanasan dengan suhu rendah akan memerlukan waktu lebih panjang untuk membunuh mikroba. Efek radiasi juga bergantung lama waktu yang diberikan dimana antimikroba khemis sering memerlukan waktu lebih panjang untuk mikroba yang lebih resisten atau endospora.

2.5.1 Mekanisme Antimikroba

Mekanisme antimikroba dapat melalui beberapa cara, antara lain (Cavalieri *et al*, 2005; Brooks *et al*, 2004; Pratiwi, 2008):

2.5.1.1 Menghambat Sintesis Dinding Sel Mikroba

Ada antimikroba yang merusak dinding sel mikroba dengan menghambat sintesis enzim atau inaktivasi enzim, sehingga menyebabkan

hilangnya viabilitas dan sering menyebabkan sel lisis. Dinding sel bakteri menentukan bentuk karakteristik dan berfungsi melindungi bagian dalam sel terhadap perubahan tekanan osmotik dan kondisi lingkungan lainnya. Di dalam sel terdapat sitoplasma dilapisi dengan membran sitoplasma yang merupakan tempat berlangsungnya proses biokimia sel. Dinding sel bakteri terdiri dari beberapa lapisan. Pada bakteri gram positif struktur dinding selnya relatif sederhana dan gram negatif relatif lebih kompleks.

Dinding sel bakteri gram positif tersusun atas lapisan peptidoglikan relatif tebal, dikelilingi lapisan *teichoic acid* dan pada beberapa species mempunyai lapisan polisakarida. Dinding sel bakteri gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan relatif tipis, dikelilingi lapisan lipoprotein, lipopolisakarida, fosfolipid dan beberapa protein. Peptidoglikan pada kedua jenis bakteri merupakan komponen yang menentukan rigiditas pada gram positif dan berperan pada integritas gram negatif. Oleh karena itu gangguan pada sintesis komponen ini dapat menyebabkan sel lisis dan dapat menyebabkan kematian sel. Antimikroba yang menyebabkan gangguan sintesis lapisan ini aktivitasnya akan lebih nyata pada bakteri gram positif.

2.5.1.2 Mengganggu Membran Sel

Di bawah dinding sel bakteri terdapat sebuah lapisan membran sel lipoprotein yang dapat disamakan dengan membran sel pada manusia. Membran ini mempunyai sifat permeabilitas selektif dan berfungsi mengontrol keluar masuknya substansi dari dan ke dalam sel, serta memelihara tekanan osmotik internal dan ekskresi produk yang sudah tidak digunakan lagi (*waste product*). Selain itu membran sel juga berkaitan dengan replikasi DNA dan sintesis dinding

sel. Oleh karena itu substansi yang mengganggu fungsinya akan sangat mematikan terhadap sel.

Membran sel merupakan lapisan molekul lipoprotein yang dihubungkan dengan ion Mg. Sehingga agen *chelating* yang berkompetisi dengan Mg selama pembentukan membran, dapat meningkatkan permeabilitas sel atau menyebabkan sel lisis. Kerusakan membran sel dapat menyebabkan kebocoran sehingga komponen-komponen penting di dalam sel seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain dapat mengalir keluar

2.5.1.3 Menghambat Sintesis dan Asam Nukleat

Penghambatan sintesis protein dapat berlangsung di dalam ribosom. Berdasarkan koefisien sedimentasinya, ribosom dikelompokkan dalam 3 grup, yaitu:

- a. Ribosom 80s, terdapat pada sel eukariot. Partikel ini terdiri dari subunit 60s dan 40s.
- b. Ribosom 70s, didapatkan pada sel prokariot dan eukariot. Partikel ini terdiri dari subunit 50s dan 30s.
- c. Ribosom 55s, hanya terdapat pada mitokondria mamalia dan menyerupai ribosom bakteri baik fungsi maupun kepekaannya terhadap antimikroba.

Penghambatan biosintesis protein pada sel prokariot ini bersifat sitostatik, karena mereka dapat menghentikan pertumbuhan dan pembelahan sel.

Asam nukleat merupakan bagian yang sangat vital bagi perkembangbiakan sel. Untuk pertumbuhannya, kebanyakan sel tergantung pada sintesis DNA, sedang RNA diperlukan untuk transkripsi dan menentukan informasi sintesis protein dan enzim. Ada beberapa jenis RNA yaitu t-RNA,

r-RNA, m-RNA, masing-masing mempunyai peranan pada sintesis protein. Begitu pentingnya asam nukleat bagi sel, maka gangguan sintesis DNA atau RNA dapat memblokir pertumbuhan sel.

2.5.2 Metode Uji Aktifitas Antimikroba

Efektivitas antimikroba terhadap spesies bakteri atau jamur berbeda antara yang satu dengan yang lain. Sensifitas setiap bakteri atau jamur patogen terhadap suatu antimikroba harus diuji dengan berbagai konsentrasi untuk menentukan tingkat konsentrasi yang menyebabkan pertumbuhan bakteri atau jamur tersebut terhambat atau mati. Dengan pengujian tersebut dapat diketahui apakah bakteri atau jamur tersebut masih sensitif atau telah resisten terhadap suatu antibiotik atau antimikroba. Uji itu berguna untuk menentukan pengobatan yang adekuat terhadap bakteri atau jamur patogen penyebab penyakit infeksi. Pengujian tersebut biasanya dilakukan *in vitro* dengan menggunakan metode difusi cakram atau dengan cara dilusi (Dzen *et al.*, 2010).

2.5.2.1 Metode Dilusi

Metode dilusi digunakan untuk menentukan kepekaan pada konsentrasi minimal, biasanya digunakan dengan ukuran mikrogram permililiter. Pada agen antimikroba diperlukan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme. Prosedur untuk menentukan aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan metode agar atau tabung. Agen antimikroba biasanya diuji dua kali dengan dilusi yang berkelanjutan dan pada konsentrasi yang rendah dapat menghambat pertumbuhan dari organisme tersebut (Murray, 1999).

2.5.2.2 Metode Dilusi Tabung

Metode ini digunakan untuk menentukan konsentrasi minimal, biasanya dalam µg/ml, suatu bahan antimikroba yang dibutuhkan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme tertentu dengan menggunakan media agar atau *broth*. Tes ini dikerjakan dengan mencampurkan bahan antimikroba dalam jumlah yang bertingkat ke dalam media perbenihan bakteri, baik dalam bentuk cair maupun padat. Media perbenihan kemudian ditanami dengan bakteri uji dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam, kemudian diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Kadar atau konsentrasi minimal bahan uji yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji yang ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan pada bahan uji dalam media yang telah diberi bakteri uji tersebut adalah Kadar Hambat Minimum (KHM). Pada kadar ini proses multipikasi bakteri terhambat. Ketika efek antimikroba dihilangkan, bakteri akan mulai tumbuh kembali. Pada konsentrasi ini efek antimikroba yang dihasilkan merupakan efek bakteristatik. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. KBM (Kadar Bunuh Minimal) obat terhadap bakteri uji adalah konsentrasi terendah obat saat pada biakan padat tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri (Dzen *et al*, 2010), atau pertumbuhan bakteri kurang dari 0,1% dari inokulum asal. Hasil test ini sangat tergantung dari ukuran inokulum dari bakteri. Campuran dalam test ini setidaknya harus memiliki 10⁶ CFU/ml (Lalitha *et al*, 2009). Metode Ini dianggap metode uji yang paling akurat untuk mengetahui aktifitas antimikroba secara terukur (Forbes, 2002).

2.5.2.3 Metode Dilusi Agar

Terdapat satu metode lain yang dapat digunakan, apabila Kadar Hambat Minimum (KHM) dengan metode dilusi tabung tidak terlihat tingkat kekeruhannya, yaitu menggunakan metode dilusi agar. Pada metode dilusi agar, cawan yang telah disterilisasi diisi agen antimikroba dengan volume yang disesuaikan dan ditambahkan agar cair dengan suhu 42-45°C, dituangkan ke dalam cawan petri plastik steril bulat atau persegi 100-mm dan dibiarkan mengeras (Jorgensen *et al*, 2009). Sebagai kontrol, disiapkan pula cawan yang diisi obat bebas dan agar. Semua agar yang telah tercampur bahan uji dituangkan ke dalam cawan dengan ketebalan 3 atau 4 mm (20 sampai 25 ml agar-agar per cawan bulat dan 30 ml untuk pelat persegi). Ukuran inokulum, secara substansial dapat mempengaruhi penentuan KHM, sehingga standarisasi inokulum diperlukan untuk memperoleh hasil yang akurat. Inokulum yang direkomendasikan untuk dilusi agar adalah 10^4 CFU per tetes. Hal ini dapat dilakukan dengan mengambil 4 atau 5 koloni dari media padat yang diinkubasi semalam, dan di inokulasikan ke dalam 4 sampai 5 ml *broth* yang mendukung pertumbuhan yang baik. *Broth* selanjutnya diinkubasi pada suhu 35° C sampai tampak keruh dan kemudian suspensi diencerkan sampai kekeruhan yang sesuai dengan kekeruhan dari Barium sulfat atau setara 0,5 standar McFarland ($\pm 10^8$ CFU/ml). Standar Mcfarland dapat dibeli atau dapat dibuat seperti yang dijelaskan oleh NCCLS. Keakuratan kepadatan standar harus diverifikasi dengan menggunakan spektrofotometer (Jorgensen *et al*, 2009).

Sedangkan metode untuk menentukan antimikroba dengan menempatkan cawan pada latar belakang gelap dan memeriksa cawan untuk melihat pertumbuhan yang terhambat pada konsentrasi terendah, yang dicatat

sebagai KHM. Apabila pertumbuhan pada inokulum koloni tunggal atau tingkat kekeruhannya samar maka tidak dianggap sebagai pertumbuhan. Oleh karena itu, KHM diartikan pada konsentrasi terendah yang menyebabkan pertumbuhan terhambat (kolonisasi kurang dari 3 CFU). Kelebihan dari pengujian dengan metode dilusi agar adalah lebih akurat dibandingkan dengan metode pengujian lainnya, lebih efisien karena menggunakan sedikit obat, dan apabila terjadi kontaminasi lebih mudah terdeteksi daripada metode dilusi tabung (Jorgensen *et al*, 2009).

2.5.3 Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram merupakan metode yang paling banyak digunakan dalam laboratorium untuk mengetahui aktivitas antimikroba suatu bahan. Metode ini banyak digunakan karena paling sederhana, paling cepat, ekonomis serta dapat diulang kembali dengan mudah (Forbes, 2002). Metode ini dikerjakan dengan menggunakan kertas saring (cakram kertas) yang mengandung bahan antimikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram tersebut kemudian ditempatkan pada media perbenihan agar padat yang telah diberi mikroba uji. Setelah diinkubasi, diameter area hambatan dihitung sebagai daya hambat obat terhadap bakteri uji (Brooks, *et al*, 2004). Area hambatan yang terbentuk ditunjukkan sebagai daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri di sekitar cakram kertas saring. Untuk mengevaluasi kepekaan hasil uji, dapat dilakukan dua cara seperti berikut ini:

2.5.3.1 Cara Kirby Bauer

Cara ini dilakukan dengan membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) disekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh NCCLS

(National Committee for Clinical Laboratory Standard). Dengan tabel NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten.

2.5.3.2 Cara Joan-Stokes

Cara ini dilakukan dengan membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Pada cara Joan-Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen *et al.*, 2010).

