

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

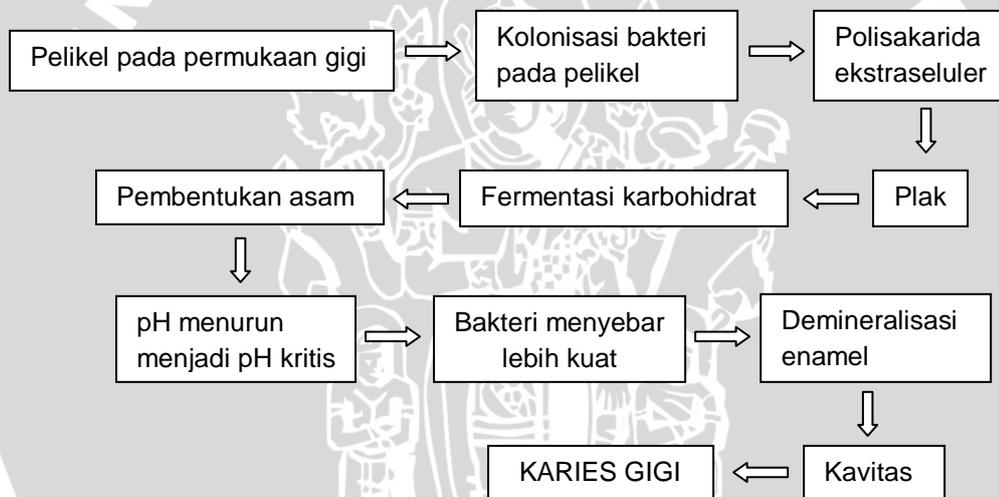
2.1 Karies Gigi

Karies gigi adalah penyakit mikrobial yang progresif pada jaringan keras gigi, ditandai dengan demineralisasi bagian inorganik dan destruksi bahan organik gigi, yang sering menyebabkan kavitas (Shafer *et al*, 2009). Karies gigi dapat terjadi pada semua permukaan gigi dimana gigi tersebut terbentuk biofilm yaitu kumpulan bakteri kariogenik yang melekat pada permukaan gigi dan melekat dalam waktu yang lama. Lesi karies terbentuk akibat perubahan ekologi dan aktivitas metabolisme dari biofilm, dimana tidak seimbangnya antara mineral pada gigi dan biofilm yang terbentuk. Metabolisme bakteri pada biofilm akan menyebabkan pH menurun. Metabolisme ini dapat meningkat dengan adanya tambahan karbohidrat yang difermentasi sehingga pH akan semakin menurun. Jika pH turun terus menerus akan menyebabkan hilangnya kalsium dan fosfat pada gigi sehingga terbentuk porus pada enamel (Fejerskov and Kidd, 2008).

2.1.1 Proses Terjadinya Karies Gigi

Proses karies gigi diawali dengan adanya pelikel pada permukaan gigi. Pembentukan pelikel dimulai beberapa menit setelah sikat gigi dan terbentuk dari adsorpsi protein saliva dan glikoprotein pada gigi. Bakteri oral akan mengkolonisasi pelikel dan akan menghasilkan polisakarida ekstraseluler. Polisakarida ekstraseluler ini membantu perlekatan bakteri ke struktur gigi dan akan membentuk plak. Ketika karbohidrat yang dikonsumsi difermentasi oleh

bakteri dalam plak akan terjadi demineralisasi pada permukaan gigi. Plak ini dapat menghasilkan kombinasi asam, tapi yang dominan adalah asam laktat. Pembentukan asam ini dapat menurunkan pH plak menjadi pH kritis (pH 5,5) sehingga menyebabkan bakteri akan menyebar lebih kuat. Terjadi peningkatan kepadatan pada biofilm yang terbentuk, perubahan populasi bakteri, pH, dan tekanan oksigen semuanya berkombinasi untuk membentuk lingkungan kariogenik pada permukaan gigi. Hal ini akan menimbulkan kerusakan enamel dan akhirnya akan membentuk kavitas (Banerjee *and* Watson, 2011; Saraf, 2006).



Gambar 2.1 Patogenesis Karies Gigi (Banerjee *and* Watson, 2011; Saraf, 2006)

Keterangan : Skema ini menggambarkan proses terjadinya karies gigi

2.2 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan salah satu species *streptococcus oral*.

S. mutans dapat ditemukan di rongga mulut dan orofaring. Mikroflora ini bersifat α -hemolisis tapi ada beberapa strain yang bersifat non-hemolisis dan β -hemolisis. *S.mutans* berbentuk kokus pada rantai, *α -hemolytic*, dan katalase-

negatif. *S.mutan* mempunyai karakteristik koloni *opaque*, tinggi, cembung, koloni berwarna putih, biasanya melekat erat pada medium, kadang-kadang di sekitar koloni dibasahi produk glukon. *Streptococcus mutans* merupakan agen penyebab paling besar terjadinya karies gigi (tapi jika tidak ada faktor predisposisi, seperti sukrosa, mikroflora ini tidak dapat menyebabkan karies). *S.mutans* mempunyai kemampuan untuk menghasilkan polisakarida ekstraselular yang dapat melekatkan organisme ke enamel. Selain itu bakteri ini juga dapat menyebabkan infeksi endokarditis (Samaranayake, 2006).

Menurut Panjaitan dalam Bidarisugma dkk (2012), *Streptococcus mutans* mempunyai sifat-sifat tertentu yang berperan penting dalam proses karies gigi, yaitu:

1. *S.mutans* memfermentasikan berbagai jenis karbohidrat menjadi asam sehingga mengakibatkan penurunan pH.
2. *S.mutans* membentuk dan menyimpan polisakarida intraselular dari berbagai jenis karbohidrat, yang selanjutnya dapat dipecahkan kembali oleh bakteri tersebut sehingga akan menghasilkan asam terus-menerus.
3. *S.mutans* mempunyai kemampuan untuk membentuk polisakarida ekstraselular (dekstran) yang menghasilkan sifat-sifat adhesif dan kohesif plak pada permukaan gigi.
4. *S.mutans* mempunyai kemampuan untuk menggunakan glikoprotein dari saliva pada permukaan gigi.

2.2.1 Klasifikasi *Streptococcus mutans*

Klasifikasi *Streptococcus mutans* menurut Bergey dalam Capuccino (2001) adalah :

Kingdom : Monera
Divisio : Firmicutes
Class : Bacilli
Order : Lactobacillales
Famili : Streptococcaceae
Genus : Streptococcus
Species : *Streptococcus mutans*



Gambar 2.2 *Streptococcus mutans* (Nugraha, 2008)

Keterangan : Bakteri *Streptococcus mutans* yang berbentuk bulat atau bulat telur dan tersusun dalam rantai.

2.2.2 Morfologi *Streptococcus mutans*

Streptococcus 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. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18°-40° Celsius. *Streptococcus mutans* biasanya ditemukan pada rongga gigi manusia yang luka dan menjadi bakteri yang paling kondusif menyebabkan karies untuk email gigi (Nugraha, 2008). Gambaran koloni bakteri *S.mutans* tersebut yaitu ukuran koloni dengan diameter 1-5 mm, permukaan koloni berbutir kasar, licin, menyerupai bunga kasar dengan

pusat menyerupai kapas. Konsistensi koloni keras dan sangat lekat, warna koloni seperti salju yang membeku, agak buram mengkilat (*opaque*), kuning buram dengan lingkaran putih. Tepi koloni tidak teratur, bulat teratur, dan oval teratur (Bidarisugma dkk, 2012).

2.2.3 Sifat Mikroskopis *Streptococcus mutans*

Secara mikroskopis, *Streptococcus mutans* merupakan bakteri gram positif, tidak bergerak aktif, tidak membentuk spora, dan mempunyai susunan rantai dua atau lebih. Berbentuk bulat dengan diameter 0,5-0,7 mm terkadang bentuknya mengalami pemanjangan menjadi batang pendek, tersusun berpasangan atau membentuk rantai pendek. Susunan rantai panjang diperoleh *S.mutans* berada dalam media *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)* (Bidarisugma dkk, 2012).

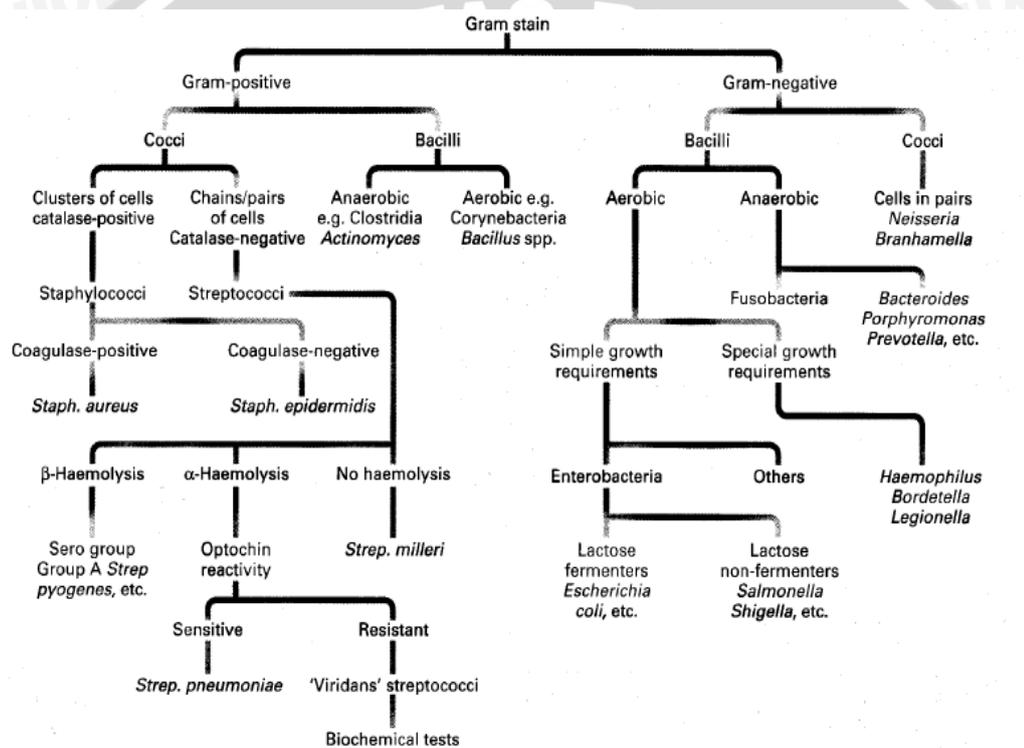
2.2.4 Identifikasi *Streptococcus mutans*

Bakteri patogen yang berasal dari spesimen klinis yang diisolasi pada kultur murni penting untuk mengidentifikasi mikroorganisme tersebut. Identifikasi bakteri (Gambar 2.3) diperlukan :

1. Pemeriksaan karakteristik koloni yang meliputi ukuran, bentuk, tinggi (datar, cembung, *umbonate*), tepi (rata, bergelombang, berfilamen), warna, bau dan tekstur; efek pada darah (α -hemolisis, β -hemolisis, atau non-hemolisis).
2. Pemeriksaan morfologi secara mikroskopis dan karakteristik pewarnaan: pewarnaan pada koloni membantu dalam identifikasi

3. Identifikasi kondisi pertumbuhan: aerob, anaerob, *capnophilic* (dapat tumbuh baik pada kondisi karbon dioksida berlebihan); tumbuh pada media yang selektif dan subur.

Hal di atas dapat menunjukkan mikroorganismenya yang diidentifikasi termasuk dalam kelompok bakteri tertentu seperti *streptococci*, *enterobacteria*, atau *clostridia* (Samaranayake, 2006).



Gambar 2.3 Identifikasi Bakteri (Samaranayake, 2006).

Keterangan: Skema ini menunjukkan tahap identifikasi bakteri yang dilakukan di laboratorium

Berdasarkan Gambar 2.3, pada *Streptococcus mutans* perlu dilakukan serangkaian identifikasi yaitu pewarnaan gram, tes katalase, dan tes optochin. Pada hasil identifikasi *Streptococcus mutans* menunjukkan bentuk kokus berantai, α -hemolisis, katalase-negatif. Pertumbuhannya tidak dihambat oleh optochin, sebaliknya pada *pneumococci* (Samaranayake, 2006).

2.2.5 Peranan *Streptococcus mutans* pada Proses Karies

Streptococcus mutans berperan penting dalam pembentukan karies. *Streptococcus mutans* adalah bakteri anaerob yang dikenal untuk menghasilkan asam laktat sebagai bagian dari metabolisme. Kemudian terdapat kemampuan *S. mutans* untuk mengikat permukaan gigi saat adanya sukrosa dengan pembentukan *water-insoluble glucan*, polisakarida yang membantu dalam mengikat bakteri pada gigi. *Water-insoluble glucan* juga telah ditemukan menurunkan konsentrasi kalsium dan fosfat pada saliva, mengurangi kemampuannya untuk memperbaiki kerusakan gigi yang disebabkan oleh bakteri asam laktat (Simon, 2007).

Menurut Slots and Taubman (1992) cara *Streptococcus mutans* menyebabkan karies pada gigi berdasarkan teori molekular patogenesis adalah sebagai berikut:

1. *Initial attachment*

Terjadi interaksi awal antar *Streptococcus mutans* dengan permukaan gigi melalui pelikel *glycoprotein* dari gigi dengan pelikel *binding* protein dari bakteri.

2. *Accumulation*

Streptococcus mutans menghasilkan enzim glukosiltransferase yang berfungsi memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Polimerisasi glukosa membentuk *water soluble glucan* (GTF-S) dan *water insoluble glucan* (GTF-I), dimana bentuk *water insoluble glucan* (GTF-I) tidak mudah larut dalam air dan bersifat lengket sehingga memudahkan akumulasi bakteri. *Glucan binding protein* dari *Streptococcus mutans* akan terikat dengan *water insoluble glucan*

dan *water soluble glucan* serta saling berikatan satu sama lain membentuk kolonisasi.

3. *Acid formation and cavitation*

Streptococcus mutans memetabolisme sakarida dan menghasilkan asam laktat. Bila jumlah asam laktat yang menempel pada gigi cukup banyak akan menyebabkan demineralisasi enamel sehingga membentuk lesi karies.

2.3 Mangga (*Mangifera indica* L.)

Klasifikasi buah mangga menurut Islam (2008) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae	(Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta	(Tumbuhan berpembuluh)
Superdivisi	: Spermatophyta	(Tumbuhan berbiji)
Divisi	: Magnoliophyta	(Tumbuhan berbunga)
Class	: Magnoliopsida	(Dikotiledon)
Subclass	: Rosidae	
Ordo	: Sapindales	
Famili	: Anacardiaceae	(<i>Sumac family</i>)
Genus	: <i>Mangifera</i> L.	(Mangga)
Species	: <i>Mangifera indica</i> L.	(Mangga)

Penyebaran mangga hampir merata di seluruh Indonesia. Nama lokalnya pun bermacam-macam di setiap daerah. Di Madura, mangga disebut pao. Di Jawa Tengah dan Jawa Timur: pelem, di Aceh: mamplam, di Bali: ampelm, di Nias: maga, di Minahasa: kawiley, di Maluku: mampalang dan di Irian Jaya: manilya (Pracaya, 2008).

Varietas mangga di Indonesia pun bermacam-macam. Species *Mangifera indica* L. terdiri atas beberapa macam mangga antara lain jenis mangga arumanis, mangga golek, mangga manalagi, mangga madu, mangga endok, dan mangga gadung (Suparman, 2007).

2.4 Mangga Gadung (*Mangifera indica* L.)

Mangga gadung banyak ditanam di Pasuruan dan Probolinggo, Jawa Timur. Ciri-ciri mangga gadung adalah batang pohonnya tidak terlalu besar kira-kira berdiameter antara 50 cm sampai 80 cm dan tingginya bisa mencapai 7 meter sampai 10 meter. Pohon ini bercabang dan rantingnya banyak sehingga tampak rimbun. Daun mangga gadung meruncing, agak pendek, dan melengkung. Bunga berbentuk majemuk, menjalar dengan bunga menggerombol rata sampai ujung bunga (Suparman, 2007).

Warna kulit buah saat muda hijau muda sedangkan saat sudah masak kulitnya berubah menjadi hijau kecoklat-coklatan. Kulitnya dilapisi lilin tipis sehingga ketika ranum kelihatan ungu atau kebiru-biruan. Buah mangga gadung rasanya manis dan berserat lembut. Buah berbau harum, berdaging tebal dengan kulit tipis, rasanya manis dan berair. Warna daging buah kuning agak sedikit kemerah-merahan. Biji mangga gadung agak pipih dan terdapat serat pendek. Panjang biji antara 5 cm sampai 10 cm dengan lebar antara 4 cm sampai 6 cm (Suparman, 2007).



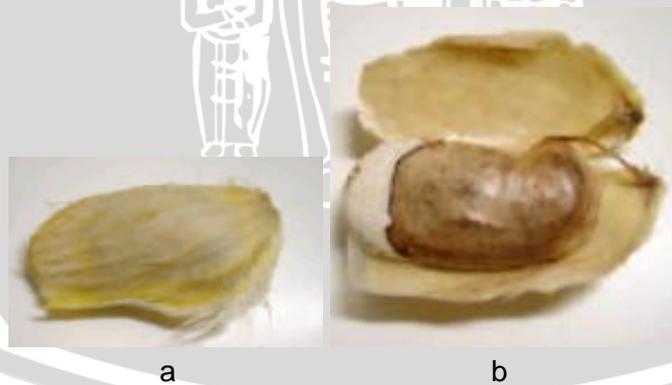
Gambar 2.4 Mangga Gadung (Sumiasri dkk, 2006)

Keterangan : Buah mangga gadung yang berbentuk bulat panjang, berlekuk dan berparuh jelas.

2.5 Biji Mangga

2.5.1 Morfologi Biji Mangga

Morfologi biji mangga secara umum merupakan biji yang berbentuk lonjong, datar, dan tunggal yang bisa berserat atau berbulu di permukaannya, tergantung pada pembudidayaannya. Di dalam kulit biji yang setebal 1-2 mm, ada lapisan tipis yang menutupi embrio tunggal, panjang 4-7 cm, lebar 3-4 cm, dan tebal 1 cm. Biji mangga terdiri dari kulit yang kuat yang menutupi inti (Kittiphoom, 2012).



Gambar 2.5 Biji Mangga (Mirghani *et al*, 2009)

Keterangan: a. Biji mangga yang masih ditutupi kulit biji dan berserat di permukaannya.
b. Biji mangga yang sudah dibuka, terlihat inti biji mangga yang berbentuk lonjong.

2.5.2 Kandungan dan Manfaat Biji Mangga

Biji mangga mengandung protein kasar, minyak, abu, serat kasar, dan karbohidrat. Hasil analisis menunjukkan bahwa kandungan tertinggi adalah karbohidrat. Karbohidrat merupakan sumber energi utama bagi tubuh. Biji mangga juga tinggi akan kandungan mineralnya seperti kalium, magnesium, fosfor, kalsium and natrium. Kalium merupakan nutrisi penting dan mempunyai peran penting dalam sintesis asam amino dan protein. Kalsium berperan dalam perkembangan gigi dan membantu pembekuan darah. Magnesium berperan penting dalam aktivitas enzim dan fosfor dibutuhkan untuk pertumbuhan tulang, fungsi ginjal, dan pertumbuhan sel (Kittiphoom, 2012).

Biji mangga mengandung asam amino yang tinggi. Biji mangga sangat kaya akan glutamat diikuti dengan leusin. Vitamin yang dikandung biji mangga juga sangat banyak terdiri dari vitamin A, vitamin E, vitamin K, vitamin B1, vitamin B2, vitamin B6, vitamin B12, dan vitamin C. Biji mangga juga mengandung *alkaloid*, *tannin*, *phytate*, *cyanide*, *saponin*, dan *oksalat* (Fowomola, 2009; Kittiphoom, 2012).

Biji mangga merupakan sumber polifenol, *phytosterol*, *campesterol*, β -*sitosterol* dan *tocopherol* yang bagus (Mirghani *et al*, 2009). Polifenol yang dikandung biji mangga antara lain *tannin*, *gallic acid*, *coumarin*, *caffeic acid*, *vanillin*, *mangiferin*, *ferulic acid*, dan *cinnamic acid*. Kandungan yang tertinggi adalah *tannin* dan *vanillin* (Abdalla *et al*, 2007). Polifenol memiliki efek antimikroba karena memiliki kemampuan untuk menonaktifkan racun bakteri. Pada suatu penelitian, ekstrak dari berbagai biji tumbuhan dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan memiliki aktivitas biosida karena kandungan polifenolnya (Ferrazzano *et al*, 2011). Biji mangga juga mengandung *alkaloid*,

flavonoid, tannin, fenol, saponin, dan anthraquinone. Adanya senyawa *fenol* dan *tannin*, secara kimia biji mangga dapat berpotensi sebagai antidiare dan antimikroba. Senyawa *fenol* pada biji mangga ini juga menunjukkan aktivitas antioksidan, antiradikal bebas, dan inhibisi oksidasi lipid (Rajan *et al*, 2011; Maisuthisakul, 2009).

2.5.3 Komponen Antibakteri Biji Mangga

Komponen antibakteri yang dimiliki biji mangga diantaranya adalah :

2.5.3.1 Tannin

Tannin mempunyai efek spasmolitik, yang dapat mengkerutkan usus sehingga gerak peristaltik usus berkurang. Efek spasmolitik ini juga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah, 2004).

2.5.3.2 Flavonoid

Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Siregar, 2011). Para peneliti lain juga menyatakan pendapat sehubungan dengan mekanisme kerja dari *flavonoid* dalam menghambat pertumbuhan bakteri, antara lain bahwa *flavonoid* menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri (Sabir, 2005).

2.5.3.3 Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar. *Alkaloid* memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme antibakteri pada *alkaloid* adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Darsana dkk, 2012).

2.5.3.4 Vanillin

Vanillin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu integritas membran sitoplasma bakteri, homeostasis pH, dan menghambat aktivitas respirasi bakteri. Perluasan kerusakan membran terjadi subletal pada sebagian besar sel dalam populasi mikroba yang dihambat, sehingga menunjukkan aksi bakteriostatik (Fitzgerald *et al*, 2004).

2.6 Mekanisme Sebagai Antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam lima kelompok: (1) menghambat metabolisme sel bakteri, (2) menghambat sintesis dinding sel bakteri, (3) mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, (4) menghambat sintesis protein sel bakteri, dan (5) menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Gunawan dkk, 2009).

2.6.1 Menghambat Metabolisme Sel Bakteri

Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila antibakteri menang bersaing dengan PABA untuk

diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya, kehidupan bakteri akan terganggu (Gunawan dkk, 2009).

2.6.2 Menghambat Sintesis Dinding Sel Bakteri

Dinding sel bakteri, terdiri dari polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antibakteri menghambat reaksi dalam proses sintesis dinding sel. Tekanan osmotik dalam sel bakteri lebih tinggi daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan bakterisid pada bakteri yang peka (Gunawan dkk, 2009).

2.6.3 Mengganggu Keutuhan Membran Sel Bakteri

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh membran sitoplasma, yang berperan sebagai barrier permeabilitas selektif, membawa fungsi transport aktif, dan kemudian mengontrol komposisi internal sel. Jika membran sitoplasma rusak maka akan merusak permeabilitas selektif dari membran sel bakteri sehingga menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Gunawan dkk, 2009).

2.6.4 Menghambat Sintesis Protein Sel Bakteri

Untuk kehidupannya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta

sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara. Antibakteri berikatan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel bakteri. Antibakteri dapat juga berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru (Gunawan dkk, 2009).

2.6.5 Menghambat Sintesis Asam Nukleat Sel Bakteri

Antibakteri berikatan dengan enzim polimerase-RNA (pada sub unit) sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Antibakteri dapat juga menghambat enzim DNA girase pada bakteri yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa muat dalam sel bakteri yang kecil (Gunawan dkk, 2009).

2.7 Uji Kepekaan Bakteri terhadap Antibakteri

Uji kepekaan bakteri terhadap antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu metode dilusi dan metode difusi (Dzen dkk., 2003).

2.7.1 Metode Dilusi

Metode dilusi ada dua macam, yaitu dilusi tabung dan dilusi agar.

2.7.1.1 Dilusi Tabung

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari suatu ekstrak. Prinsip dari metode ini adalah dengan menggunakan satu seri tabung reaksi dan sejumlah sel bakteri yang diuji, kemudian masing-masing tabung diisi obat yang telah diencerkan secara serial, selanjutnya seri tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri) adalah KHM dari ekstrak tersebut. Biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah ekstrak pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni adalah KBM (Konsentrasi Bunuh Minimal) dari suatu ekstrak terhadap bakteri uji (Dzen dkk., 2003).

2.7.1.2 Dilusi Agar

Metode ini serupa dengan dilusi cair namun perbedaannya pada media yaitu dengan media agar. Pada dilusi agar tiap konsentrasi antimikroba dicampur dengan media agar, lalu ditanami suspensi mikroba. Keuntungan metode ini satu konsentrasi agen mikroba dapat digunakan untuk beberapa mikroba uji (Pratiwi, 2008).

2.7.2 Metode Difusi

Metode difusi ada tiga macam, yaitu difusi disk, difusi lubang (sumuran), dan difusi silinder.

2.7.2.1 Difusi Disk

Difusi disk menyediakan ukuran kualitatif dari kemampuan sebuah antibakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Suatu ekstrak/obat dijenuhkan ke dalam kertas saring (kertas disk). Kertas disk yang mengandung ekstrak/obat tertentu ditanam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan bakteri uji, kemudian diinkubasikan 37°C selama 18-24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling disk (Dzen dkk, 2003; Kusmiyati dan Agustini, 2006).

Media perbenihan agar yang digunakan dalam difusi disk ini dipilih berdasarkan kepekaan bakteri terhadap antibiotik. Macam-macam media perbenihan agar yaitu *Mueller-Hinton agar* digunakan untuk Gram-negatif bacilli dan *Staphylococcus spp.*, *blood agar* untuk *Streptococcus spp.* dan *Enterococcus spp.*, *chocolate agar* untuk *Haemophilus influenzae*, dan *Brain Heart Infusion Agar* digunakan untuk mikroorganisme yang bersifat fastidious seperti *Streptococci*, *Meningococci*, dan *Pneumococci* (Parija, 2009).

Untuk mengevaluasi hasil uji difusi disk (apakah isolat mikroba sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dua cara yaitu cara *Kirby Bauer* dan cara *Joan-Stokes* (Dzen dkk, 2003)

- a. Cara *Kirby Bauer*, yaitu dengan cara membandingkan diameter dari area jernih (zona hambat) di sekitar cakram.
- b. Cara *Joan-Stokes*, yaitu dengan cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji.

2.7.2.2 Difusi Lubang (Sumuran)

Difusi lubang dilakukan dengan cara membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang (Kusmiyati dan Agustini, 2006).

2.7.2.3 Difusi Silinder

Difusi silinder dilakukan dengan cara meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder (Kusmiyati dan Agustini, 2006).

2.8 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu cara pemisahan senyawa organik dari tumbuhan atau mikroorganisme. Simplisia yang di ekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain. Senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak seperti atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain (Kurniawati, 2008).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan beberapa metode. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan yang akan diekstrak,

daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi, dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna (Gunawan, 2011). Ekstraksi dapat dilakukan dengan cara dingin dan panas. Cara dingin yaitu metode maserasi dan perkolasi sedangkan cara panas antara lain yaitu metode reflux, soxhletasi, digestasi, destilasi uap, infus, dan dekoktasi (Kurniawati, 2008).

2.8.1 Ekstraksi Cara Dingin

2.8.1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstraksian sederhana dengan cara merendam sampel dalam pelarut selama waktu tertentu dan dilakukan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu kamar, sehingga sampel menjadi lunak dan larut. Jumlah pelarut yang dipakai tergantung pada banyaknya sampel. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi larutan zat aktif didalam sel dan diluar sel maka larutan terpekat didesak keluar. Proses ini berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel. Pelarut yang digunakan dapat berupa air, etanol, metanol, etanol-air atau pelarut lainnya. (Ditjen POM, 2000).

Keuntungan cara ekstraksi dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan ekstraksi kurang sempurna (Ditjen POM, 2000).

2.8.1.2 Perkolasi

Perkolasi adalah proses pengekstraksian dengan melewati pelarut yang sesuai secara lambat pada sampel dalam suatu perkolator. Cara ini lebih sempurna dari maserasi. Zat berkhasiat yang rusak atau tidak rusak dengan

pemanasan dapat tertarik seluruhnya, tetapi dibutuhkan pelarut yang lebih banyak. Perkolasi menggunakan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada suhu ruangan. Prosesnya terdiri dari tahap pengembangan bahan, maserasi antara, perkolasi sebenarnya (penetesan / penampungan ekstrak) secara terus menerus sampai diperoleh ekstrak yang jumlahnya satu sampai lima kali volume bahan (Ditjen POM, 2000).

2.8.2 Ekstraksi Cara Panas

2.8.2.1 Refluks

Refluks merupakan ekstraksi dengan pelarut yang dilakukan pada titik didih pelarut tersebut, selama waktu tertentu dan sejumlah pelarut tertentu dengan adanya pendingin balik (kondensor). Umumnya dilakukan tiga sampai lima kali pengulangan proses pada residu pertama, sehingga termasuk proses ekstraksi sempurna (Ditjen POM, 2000).

2.8.2.2 Soxhletasi

Soxhletasi menggunakan pelarut sangat sedikit dan terus menerus diperbaharui, umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi konstan dengan adanya pendingin balik (kondensor) (Ditjen POM, 2000).

2.8.2.3 Digestasi

Digestasi adalah proses pengekstraksian yang hampir sama dengan maserasi tapi dengan menggunakan pemanasan pada suhu 30°-40°C. Cara ini digunakan untuk sampel pada suhu biasa tidak tersari dengan baik. Jika pelarut

yang digunakan mudah larut pada suhu kamar maka dapat digunakan alat pendingin tegak (Kurniawati, 2008).

2.8.2.4 Infus

Infusum adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15-20 menit (Kurniawati, 2008).

2.8.2.5 Dekoktasi

Metode dekok sama dengan metode infusum, hanya saja waktu pemanasannya lebih lama yaitu sekitar 30 menit dengan suhu $\geq 30^{\circ}\text{C}$ dan temperaturnya sampai titik didih (Kurniawati, 2008).

2.8.2.6 Destilasi Uap

Destilasi uap adalah ekstraksi senyawa kandungan menguap (minyak atsiri) dari bahan (simplisia) dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari kental secara kontinu sampai sempurna dan di akhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisah sempurna atau memisah sebagian (Kurniawati, 2008).

2.9 Pelarut

Pemilihan larutan pelarut harus mempertimbangkan banyak faktor. Pelarut yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak

mudah terbakar, tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Larutan pengekstraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa-senyawa yang diinginkan (Yuswantina, 2009).

Metode ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda pada pelarut yang berbeda kepolarannya. Terdapat tiga golongan pelarut yaitu pelarut polar, pelarut semi polar, dan pelarut non polar (Pranoto dkk, 2012).

2.9.1 Pelarut polar

Pelarut polar memiliki tingkat kepolaran yang tinggi, cocok untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang polar dari tanaman seperti senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik, karotenoid, dan tannin. Pelarut polar cenderung universal digunakan karena biasanya walaupun polar, tetap dapat menyari senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran lebih rendah. Contoh pelarut polar adalah air, metanol, etanol, dan asam asetat (Pranoto dkk, 2012).

2.9.2 Pelarut Semi Polar

Pelarut semi polar memiliki tingkat kepolaran yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut polar. Pelarut ini baik untuk mendapatkan senyawa-senyawa semipolar dari tumbuhan seperti senyawa fenol dan terpenoid. Contoh pelarut ini adalah aseton, etil asetat, dan kloroform (Pranoto dkk, 2012).

2.9.3 Pelarut Non Polar

Pelarut non polar, hampir sama sekali tidak polar. Pelarut ini baik untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang sama sekali tidak larut dalam pelarut polar

seperti hidrokarbon, asam lemak, asetonin, dan terpen. Senyawa ini baik untuk mengekstrak berbagai jenis minyak. Contoh pelarut ini adalah heksana dan eter (Pranoto dkk, 2012).

