

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Periodontitis

Periodontitis adalah inflamasi jaringan periodontal yang disebabkan oleh bakteri dan menyebabkan kerusakan yang parah pada ligamen periodontal dan tulang alveolar diikuti dengan peningkatan kedalaman *probing*, resesi ataupun keduanya. Jaringan periodontal terdiri dari gingival, tulang alveolar, sementum dan ligament periodontal. Perbedaan antara periodontitis dan gingivitis adalah terjadinya kehilangan perlekatan jaringan periodontal yang disertai dengan menurunnya densitas tulang alveolar pada periodontitis (Carranza *et al.*, 2012).

Pada workshop internasional *American Academy of Periodontology* tahun 1999, periodontitis diklasifikasikan menjadi:

2.1.1 Periodontitis Kronis

Periodontitis kronis sering juga disebut dengan periodontitis dewasa. Dinamakan demikian karena terjadi pada usia 35 tahun ke atas, dengan perjalanan penyakit yang lambat (Fedi *et al.*, 2004). Periodontitis kronis diawali dari gingivitis yang terjadi akibat akumulasi plak dan kalkulus supragingiva maupun subgingiva. Bakteri yang ditemukan pada penyakit ini antara lain *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythi*, *Prevotella Intermedia*, *Prevotella nigrescen*, *Fusobacterium Nucleatum* dan lain-lain, dan yang merupakan bakteri patogen utama adalah *Porphyromonas gingivalis*. Periodontitis kronis dapat diketahui dari gejalanya yang berupa adanya peningkatan kedalaman poket

periodontal, *bleeding on probing* dan resorpsi tulang yang dapat dilihat secara radiologis (Carranza *et al.*, 2012).

Menurut Carranza *et al.* (2012), periodontitis kronis dapat diklasifikasikan lagi menjadi:

2.1.1.1 Periodontitis Kronis Lokalis

Periodontitis lokalis terjadi apabila letak jaringan periodontal yang mengalami kerusakan kurang dari 30% jumlah gigi dalam rongga mulut.

2.1.1.2 Periodontitis Kronis General

Periodontitis lokalis terjadi apabila letak jaringan periodontal yang mengalami kerusakan lebih dari 30% jumlah gigi dalam rongga mulut.

2.1.2 Periodontitis Agresif

Periodontitis agresif merupakan jenis periodontitis yang berkembang dengan sangat cepat dan sering menyerang pasien berusia muda, dimulai dari sekitar masa pubertas hingga usia 35 tahun. Periodontitis agresif dibedakan dari periodontitis kronis dengan kecepatan perkembangannya, tidak adanya akumulasi plak dan kalkulus, respon imun pasien dan adanya tendensi kasus yang sama pada anggota keluarga lain (Lindhe *et al.*, 2003). Bakteri subgingiva yang berperan dalam periodontitis agresif adalah bakteri gram negatif anaerob, seperti *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* dan sebagainya. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menjadi bakteri yang paling sering ditemukan menyebabkan periodontitis agresif (Kesic *et al.*, 2009).

Menurut Carranza *et al.* (2012), periodontitis agresif dapat diklasifikasikan lagi menjadi:

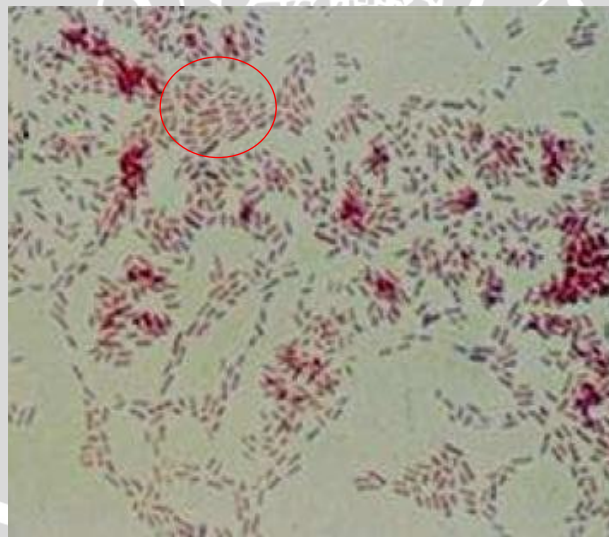
2.1.2.1 Periodontitis Agresif Lokalis

Periodontitis agresif lokalis sebelumnya bernama periodontitis juvenile lokalis. Periodontitis ini mulai berkembang pada masa pubertas, sering ditemukan pada wanita dan mengenai minimal dua gigi, yaitu insisif dan molar.

2.1.2.2 Periodontitis Agresif General

Periodontitis agresif general memiliki karakteristik yaitu hilangnya perlekatan interproksimal pada tiga gigi atau lebih, selain insisif dan molar.

2.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada pembesaran 1000x menunjukkan bentuk kokobasil kecil berwarna merah (Andayani *dkk.*, 2014)

2.2.1 Taksonomi

Aggregatibacter actinomycetemcomitans berkaitan erat dengan famili *Pasteurellaceae*, yang pada kemudian hari diklasifikasikan lagi ke dalam genus baru, *Aggregatibacter* bersamaan dengan spesies terdekatnya, *Aggregatibacter* (*Haemophilus*) *aphrophilus* dan *Aggregatibacter* (*Haemophilus*) *segnis*. Bakteri ini terbukti secara genetikal heterogen, yang berarti mengandung garis silsilah revolusioner yang memiliki potensi patogen berbeda (Åberg, 2013).

Tabel 2.1 Taksonomi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Klasifikasi Umum	Klasifikasi Bakteri
Kingdom	<i>Bacteria</i>
Filum	<i>Proteobacteria</i>
Kelas	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordo	<i>Pasteurellales</i>
Famili	<i>Pasteurellaceae</i>
Genus	<i>Aggregatibacter</i>
Spesies	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> , <i>Aggregatibacter segnis</i>

(Sumber: Mythireyi and Krishnababa, 2012)

2.2.2 Karakteristik

Aggregatibacter actinomycetemcomitans adalah bakteri gram negatif fakultatif anaerob, tidak bergerak, capnophilic (membutuhkan suasana dengan kadar CO₂ sebesar 5-10% untuk tumbuh) dan berbentuk kokobasil yang memiliki *fimbria*. Bakteri ini tumbuh pada suhu 37°C namun juga dapat tumbuh pada suhu 20-42°C (Kesic et al., 2009). Bakteri kemoorganotropik & fermentatif ini memiliki

ukuran sekitar 0,4-0,5µm x 1-1,5µm (Åberg, 2013). Bakteri ini membentuk koloninya setelah inkubasi selama 24 sampai 48 jam. Awalnya, koloni tampak halus, berbentuk sirkular, translusen dan melekat pada plat dengan sangat erat dengan diameter 0,5-1mm dikelilingi tepi berbentuk tak beraturan dan susah untuk dilepaskan. Pada masa inkubasi yang panjang, sekitar 5-7 hari, koloni bakteri dapat berkembang berupa densitas sentral dengan empat atau enam yang membentuk bintang pada pembesaran mikroskop 1000x. Pada saat ini, fimbria menghilang sehingga perlekatan dengan agar menjadi berkurang (Mythireyi and Krishnababa, 2012).

Tabel 2.2 Identifikasi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Uji Identifikasi	Hasil Identifikasi
Morfologi koloni	Melekat pada agar, berbentuk bintang
Tampakan mikroskopis	Gram negatif, berbentuk kokobasil
Katalase	+
Oksidase	+
ONPG	-
Indole	-
Urease	-
Reduksi Nitrat	+
Glukosa, Maltosa, Galaktosa	+
Laktosa, Sukrosa, Sorbitol	-
Hemolisis	-

(Sumber: Henderson and Ready, 2006)

Keterangan:

+ : reaksi positif

- : reaksi negatif

2.2.2.1 Pewarnaan Gram

Bakteri merupakan suatu mikroorganisme yang tidak bewarna, transparan dan sulit untuk dilihat secara langsung. Untuk itu diperlukan suatu pewarnaan pada bakteri untuk mengidentifikasi bakteri tersebut. Perbedaan hasil antara bakteri gram positif dan gram negatif bergantung pada struktur dinding sel bakteri. Warna akhir tes pewarnaan gram untuk bakteri gram negatif adalah merah. Setelah bakteri ditentukan jenisnya gram negatif atau positif, kemudian dilihat bentuknya dengan menggunakan mikroskop (Burton and Engelkrik, 2004). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* berbentuk kokobasil dengan ukuran yang sangat kecil (Åberg, 2013).

2.2.2.2 Uji Katalase

Uji katalase digunakan untuk membedakan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari *Aggregatibacter aphropilus* dan *Aggregatibacter segnis*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memiliki enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 , sehingga menunjukkan adanya gelembung udara apabila diuji katalase (Tortora et al., 2010)

2.2.2.3 Uji Oksidase

Sitokrom oksidase merupakan hemoprotein yang mengandung zat besi dan merupakan rantai akhir respirasi aerob, yaitu dengan mentransfer elektron (hidrogen), kemudian bereaksi dengan oksigen dan membentuk molekul air. Sistem sitokrom dapat ditemukan pada bakteri aerob atau fakultatif anaerob. Tes oksidase ini penting untuk mengidentifikasi bakteri yang tidak membuat enzim ini atau anaerob obligat. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil positif pada uji ini yaitu berupa perubahan warna pada reagen menjadi ungu, ungu tua sampai kehitam-hitaman (Syahrurachman, 2009).

2.2.2.4 Uji Hemolisis

Uji hemolisis digunakan untuk mengklasifikasikan bakteri tertentu dengan cara mengamati kemampuannya untuk menginduksi hemolisis bila ditanam pada agar darah. Sebuah zat yang dapat menyebabkan hemolisis adalah hemolisin. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tidak memiliki hemolisin sehingga tidak ada reaksi pada media agar dan menunjukkan γ hemolisis (Kumala, 2006).

2.2.2.5 Uji Biokimia dengan *Microbact Kit*

Perbedaan metabolisme bakteri dapat dilihat dari reaksi biokimia yang dipakai untuk melakukan identifikasi dan klasifikasi bakteri. Setiap bakteri membutuhkan energi untuk bertahan hidup. Salah satu sumber energi berasal dari fermentasi karbohidrat. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dapat menfermentasi glukosa, maltosa, galaktosa namun tidak dapat menfermentasi laktosa, sukrosa, sorbitol (Aneja, 2003; Hogg, 2005).

Microbact kit 12 (12A, 12B dan 12E) atau 24 (24E) menggambarkan tes biokimia. Identifikasi bakteri dilakukan berdasarkan perubahan pH dan penggunaan substrat oleh bakteri. *Microbact* Gram negatif 12A (*strip format*) dan 12E (*microplate format*) dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yang negatif oksidase, menfermentasi glukosa dan nitrat serta berguna untuk menentukan bakteri patogen seperti *Enterobacteriaceae*. *Microbact* Gram negatif 12B digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yang positif oksidase, tidak menfermentasi glukosa dan nitrat. nitrat serta berguna untuk menentukan bakteri patogen seperti *Enterobacteriaceae*. *Microbact* Gram negatif 24E merupakan kombinasi dari *microbact* 12A (atau 12E) dan 12B yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan reaksi biokimia yang tidak biasa (Mugg and Hill, 1981).

2.2.3 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebagai Penyebab Periodontitis Agresif

Aggregatibacter actinomycetemcomitans merupakan bakteri rongga mulut yang paling berhubungan dengan periodontitis agresif, yang sering terjadi pada usia muda (Åberg, 2013). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dapat ditemukan pada plak gigi individu sehat dimana bakteri ini merupakan flora normal yang persisten (Elamin, 2012). Bakteri ini dapat menimbulkan kerusakan pada jaringan gingiva, resorpsi tulang alveolar bahkan hingga tanggalnya gigi. Bakteri ini banyak ditemukan pada sulkus gingival dan berpotensi untuk membentuk koloni di permukaan gigi. Apabila bakteri ini terdapat pada aliran saliva juga dapat menimbulkan infeksi (Andayani dkk., 2013).

Bakteri ini memiliki dua faktor penting yang dapat mempengaruhi patogenesis periodontitis agresif. Dua faktor tersebut yaitu faktor virulensi dan faktor adhesi. Virulensi merupakan kemampuan suatu organisme untuk menyebabkan infeksi. Virulensi pada bakteri meliputi kemampuan untuk menembus sel hospes, merusak pertahanan hospes, replikasi pada lingkungan baru dan menunjukkan sifat patologis spesifik (Sriraman *et al.*, 2014). Selain faktor virulensi, hal lain yang berperan dalam patogenesis *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebagai penyebab periodontitis agresif adalah adhesin. Adhesin adalah komponen permukaan sel bakteri yang berperan dalam perlekatan permukaan sel eukarotik. Adhesi merupakan hal penting dalam kolonisasi dan invasi bakteri (Paino, 2013).

2.2.3.1 Faktor Virulensi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Faktor virulensi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* beserta mekanisme virulensinya meliputi:

a. Leukotoksin

Leukotoksin merupakan salah satu faktor virulensi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang paling penting. Mekanisme leukotoksin oleh bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah dengan membentuk lubang-lubang pada membran sel leukosit. Oleh karena itu, fungsi leukosit yang berhubungan dengan antigen seperti leukosit PMN, makrofag/monosit menjadi terganggu. Proses ini berlangsung sangat cepat sehingga dapat mengarah ke kematian sel, lisis sel hingga resorpsi tulang (Mythireyi and Krishnababa, 2012; Paino, 2013). Dalam konsentrasi rendah, leukotoksin menyebabkan apoptosis sel T dan PMN. Sedangkan dalam konsentrasi tinggi, leukotoksin menyebabkan kematian sel atau nekrosis (Tatakis and Kumar, 2005).

b. Sitotoksin (*cytolethal distending toxin/Cdt*)

Cdt menunjukkan penghambatan proliferasi sel hospes dengan menyebabkan apoptosis dan penghentian siklus sel. Cdt menghasilkan tiga operon gen berupa *cdtA*, *cdtB* dan *cdtC* yang sering ditemukan pada bakteri gram negatif. *CdtB* merupakan komponen aktif yang berfungsi untuk memasuki DNA sel hospes dan mendegradasi kromosom sehingga menyebabkan penghentian siklus sel dan kerusakan DNA itu sendiri. Sedangkan *cdtA* dan *cdtC* berfungsi sebagai fasilitator supaya *cdtB* dapat memasuki DNA sel hospes. Dalam kaitannya dengan periodontitis agresif, *cdt* berperan dalam mengganggu perbaikan barier epitel dan *remodeling* jaringan ikat periodontal (Mythireyi and Krishnababa, 2012; Paino, 2013).

c. Lipopolisakarida

Lipopolisakarida mengandung 30% karbohidrat, 30% lipid A, 10-12% heksosamin, 3-10% fosfat & heptosa. Lipopolisakarida berperan dalam

menghambat kolagen dan sintesis DNA serta menstimulasi resorpsi tulang. Lipopolisakarida juga menstimulasi makrofag untuk menghasilkan interleukin 1α , interleukin 1β dan mRNA beserta proteinnya yang berfungsi dalam inflamasi jaringan dan resorpsi tulang. Lipopolisakarida juga toksik terhadap fibroblast sehingga berpotensi dalam menghambat proliferasi fibroblast (Sriraman *et al.*, 2014).

d. Bakteriosin

Bakteriosin merupakan protein yang dihasilkan oleh bakteri dan berfungsi meningkatkan permeabilitas membran sel target sehingga dapat ditembus oleh bakteri (Sriraman *et al.*, 2014). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memiliki bakteriosin spesifik yang disebut *Actinomycetemcomitin* (Mythireyi and Krishnababa, 2012).

e. Faktor immunosupresi

Aggregatibacter actinomycetemcomitans menghasilkan faktor immunosupresi yang mempengaruhi regulasi sel limfosit B dan limfosit T. Faktor tersebut berfungsi dalam menghambat aktivasi DNA, RNA dan sel protein T oleh mitogen atau antigen (Sriraman *et al.*, 2014).

f. Kolagenase

Aggregatibacter actinomycetemcomitans menghasilkan enzim kolagenase yang dapat merusak kolagen tipe 1. Hal ini dapat mendorong terjadinya degradasi kolagen dan gangguan pada jaringan ikat periodontal (Eley and Manson, 2004). Selain itu, kolagenase dapat menyebabkan berkurangnya densitas kolagen yang merupakan gambaran klinis periodontitis (Sriraman *et al.*, 2014).

2.2.3.2 Faktor Adhesi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Faktor adhesi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* antara lain:

a. Fimbria atau pili

Merupakan permukaan luar yang tebal dari sel. Fimbria berfungsi sebagai penentu dalam perlekatan awal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada permukaan sel dalam rongga mulut (Sriraman *et al.*, 2014). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menggunakan fimbria ketika melekat pada permukaan sel hospes melalui ikatan nonspesifik (Paino, 2013).

b. Vesikel

Aggregatibacter actinomycetemcomitans memiliki banyak vesikel pada permukaan selnya. Vesikel berfungsi sebagai perlekatan awal ketika bakteri berinteraksi secara langsung dengan reseptor pada permukaan sel hospes (Paino, 2013).

c. Interaksi dengan bakteri lain

Aggregatibacter actinomycetemcomitans dapat berkolonisasi dengan cara melekatkan diri pada permukaan sel bakteri lainnya.

2.3 Lebah

Lebah madu yang terdapat di Indonesia terdiri atas lebah madu lokal dan lebah madu luar negeri. Lebah lokal asli dari Indonesia antara lain *Apis dorsata* dan *Apis cerana* dengan temperamen yang ganas (Sihombing, 1992). Namun, lebah madu luar negeri jenis *Apis mellifera* lebih banyak dibudidayakan di Indonesia karena sifatnya yang jinak dan jumlah madu yang dihasilkan lebih banyak daripada lebah madu jenis lain. Selain madu, lebah madu *Apis mellifera* juga menghasilkan bahan bermanfaat lainnya seperti propolis, royal jelly dan

pollen. Karena itulah, nilai ekonomi lebah madu jenis *Apis mellifera* sangat tinggi (Sarwono, 2007).

2.3.1 *Apis mellifera*

Lebah ini berasal dari daerah subtropis, Benua Eropa. Panjang ratu lebah *Apis mellifera* sekitar 1,9 cm, lebah jantan sekitar 1,65 cm dan lebah pekerja sekitar 1,35 cm. Lebah madu ini memiliki panjang sayap 0,8-0,95 cm dan panjang belalai 0,55-0,71 cm. Lebah madu ini memiliki ciri khas gelang bewarna kuning di belakang abdomennya. Warna tubuh bervariasi dari coklat gelap sampai kuning hitam (Sarwono, 2007).

Tabel 2.3 Taksonomi *Apis mellifera*

Klasifikasi Umum	Klasifikasi Lebah
Kingdom	<i>Animalia</i>
Filum	<i>Arthropoda</i>
Kelas	<i>Insecta</i>
Ordo	<i>Hymenoptera</i>
Famili	<i>Apidae</i>
Genus	<i>Apis</i>
Spesies	<i>Apis andreniformis</i> , <i>Apis cerana</i> , <i>Apis dorsata</i> , <i>Apis flora</i> , <i>Apis laboriosa</i> , <i>Apis koschevnikovi</i> , <i>Apis mellifera</i>

(Sumber: Pusat Perlebahan Apiari Pramuka, 2005)

Famili *Apidae* merupakan jenis lebah penghasil madu sejati. Yang paling berperan penting sebagai penghasil madu dan lilin adalah lebah madu dari genus *Apis*. Spesies yang saat ini banyak dibudidayakan adalah *Apis mellifera* (Sarwono, 2007).



Gambar 2.2 Lebah *Apis mellifera*
(Sumber: <http://www.binaapiari.com/lebah-madu>)

2.4 Propolis Lebah *Apis mellifera*

Propolis merupakan resin alami yang dihasilkan lebah madu dari kuncup bunga berbagai macam tanaman, yang dibawa ke sarang dalam bukul sarinya dan kemudian lebah mencampurnya dengan lilin (Sarwono, 2007). Kata propolis berasal dari bahasa Yunani, yaitu *pro* yang berarti pertahanan terhadap sesuatu dan *polis* yang berarti komunitas atau kota sehingga dapat disimpulkan bahwa propolis adalah produk alami yang digunakan sebagai pertahanan sarang lebah (Wagh, 2013). Dalam kondisi ruang, propolis merupakan suatu cairan lengket, namun akan berubah menjadi keras apabila berada dalam suhu yang lebih rendah.

Propolis digunakan untuk menambal celah-celah kecil dalam sarang lebah (sekitar 6,35 mm), sedangkan celah-celah yang lebih besar dilapisi dengan lilin yang juga dihasilkan lebah tersebut sendiri. Warna, aroma, dan kandungan propolis bervariasi. Propolis dapat berwarna putih, kuning, hijau merah, hitam tetapi

kebanyakan bewarna coklat terang sampai gelap. Variasi sifat kimia dan fisik propolis tergantung pada tanaman sumbernya yang dikonsumsi lebah (Hotnida, 2011).

Propolis sudah digunakan sejak dahulu sebagai obat tradisional untuk berbagai penyakit. Ilmuan Yunani dan Roman menggunakan propolis sebagai disinfektan dan antiseptik mulut dan untuk mengobati luka (Fokt *et al.*, 2010).



Gambar 2.3 Propolis yang dihasilkan lebah *Apis mellifera* (Trubus, 2010)

2.4.1 Komposisi Propolis Lebah *Apis mellifera*

Komposisi propolis sangatlah bervariasi, tergantung dari sumber resin yang didapatkan lebah. Tingginya variasi tersebut dipengaruhi jenis pohon, suhu lokasi, bahkan waktu ketika propolis dikumpulkan (Suranto, 2007). Propolis mengandung resin dan balsam (50-70%), minyak esensial dan lilin (30-40%), polen (5-10%) dan zat bermanfaat lainnya seperti asam amino, mineral, vitamin A, B kompleks, E dan kandungan bioaktif berupa flavonoid atau bioflavonoid (vitamin P), fenol dan komponen aromatik (Parolia *et al.*, 2010).

Menurut penelitian pendahuluan yang dilakukan Halim *dkk.* (2012), mengenai analisis fitokimia ekstrak propolis, komposisi yang dihasilkan yang berperan sebagai antibakteri yaitu flavonoid, senyawa fenolat, tanin, minyak esensial, steroid, saponin, alkaloid dan glikosida. Selain itu, efektivitas ekstrak propolis yang dihasilkan lebah *Apis mellifera* sebagai antibakteri belum banyak diteliti.

2.4.1.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa yang larut dalam air, dapat diekstraksi dengan etanol (Harborne, 1996). Flavonoid merupakan suatu komponen alam yang diketahui memiliki efek farmakologik seperti antioksidatif, antiinflamasi dan antidiuretik serta memiliki kemampuan sebagai zat antimikroba (Pepelijnjak *et al.*, 2005). Flavonoid adalah senyawa fenolat yang terhidroksilasi dan merupakan senyawa $C_6-C_3-C_6$ dimana C_6 diganti dengan cincin benzene dan C_3 adalah rantai alifatik yang terdiri dari cincin piran. Ada tujuh tipe flavonoid, yaitu flavon, flavonol, khalkon, xanton, isoflavon dan bivalvon (Mustarichie *dkk.*, 2011). Mekanisme antibakteri dari flavonoid ada tiga macam, yang pertama dengan cara menghambat sintesis asam nukleat. Cara kedua yaitu dengan menghambat fungsi membran sitoplasma dengan merusak fluiditas membran pada regio hidrofilik dan hidrofobik sehingga fluiditas lapisan luar dan lapisan dalam membran akan menurun. Dan yang terakhir adalah dengan menghambat metabolisme energi pada bakteri (Majidah, 2014).

2.4.1.2 Senyawa Fenolat

Senyawa fenolat merupakan senyawa bioaktif yang paling simpel yang terdiri dari sebuah cincin fenol tersubstitusi. Salah satu contoh dari golongan

senyawa fenolat asam kafeat yang efektif dalam melawan virus dan bakteri. Asam kafeat dan asam sinamat termasuk kelompok besar dari turunan senyawa fenilpropan yang mempunyai tingkat oksidasi tinggi. Mekanismenya dalam melawan bakteri adalah menghambat enzim dengan komponennya yang teroksidasi, melalui interaksinya dengan protein atau kelompok sulfhydryl (Cowan, 1999; Mustarichie *dkk.*, 2011).

2.4.1.3 Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa kimiawi yang termasuk dalam golongan polifenol. Kemampuan tanin sebagai antibakteri didasarkan pada aksinya pada membran. Tanin diduga dapat mengikat salah satu protein yang dimiliki oleh bakteri yaitu adhesin. Apabila hal ini terjadi, maka dapat merusak ketersediaan *reseptor* pada permukaan sel bakteri. Tannin telah dibuktikan dapat membentuk kompleks senyawa yang *irreversibel* dengan prolin, suatu protein lengkap, yang mana ikatan ini mempunyai efek penghambatan sintesis protein untuk membentuk dinding sel (Agnol *et al.*, 2003; Majidah, 2014).

2.4.1.4 Minyak Esensial

Aroma suatu tanaman terdapat dalam *quinta essential* atau fraksi minyak esensial. Minyak ini merupakan metabolis sekunder yang sangat tinggi dalam senyawa berdasarkan struktur isoprene-nya. Minyak tersebut adalah terpene, yang dinamakan terpenoid apabila mengandung komponen lain seperti oksigen. Terpene atau terpenoid berperan aktif dalam melawan bakteri, jamur dan protozoa. Mekanisme terpenoid diperkirakan berhubungan dengan disruptsi membran oleh komponen lipofilik (Cowan, 1999).

2.4.1.5 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa amina tersier dan yang lainnya yang terdiri dari nitrogen primer, sekunder dan quartener. Alkaloid biasanya bersifat basa dengan atom nitrogen yang berupa cincin aromatik (Mustarichie *dkk.*, 2011). Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah kemampuannya untuk masuk menembus dinding sel dan/atau DNA bakteri (Cowan, 1999). Selain itu, menurut Karou *et al.* (2005) senyawa alkaloid dapat menyebabkan lisis sel dan perubahan morfologi bakteri.

2.4.1.6 Saponin

Saponin adalah produk glikosida alam dengan berat molekul tinggi. Mekanisme saponin sebagai agen antibakteri adalah melalui interaksi dengan kolesterol pada membran sel dan menyebabkan membran sel mengalami modifikasi lipid yang akan mengganggu kemampuan bakteri untuk berinteraksi dengan membran yang sudah mengalami modifikasi tersebut. Terganggunya interaksi antara bakteri dengan membran selnya akan menyebabkan kemampuan bakteri untuk merusak atau berinteraksi dengan hospes akan terganggu. Ketika membran sel terganggu, zat antibakteri akan dapat dengan mudah masuk ke dalam sel dan akan mengganggu metabolisme hingga akhirnya terjadilah kematian bakteri (Majidah, 2014).

2.4.2 Propolis Lebah *Apis mellifera* sebagai antibakteri

Antibakteri adalah zat yang mengganggu proses pertumbuhan bakteri. Berdasar cara kerjanya, antibakteri dibedakan menjadi bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriostatik bekerja dengan menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan bakterisidal bekerja mematikan bakteri. Zat yang bersifat bakterisidal

biasanya memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan yang bersifat bakteriostatik (Chomnawang *et al.*, 2005). Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri disebut sebagai kadar hambat minimal (KHM) dan kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh bakteri disebut kadar bunuh minimal (KBM) (Brooks *et al.*, 2007).

Secara umum, mekanisme suatu zat antibakteri, menurut Brooks *et al.* (2007) antara lain,

2.4.2.1 Menghambat sintesis dinding sel bakteri

Dinding sel bakteri berfungsi sebagai pelindung substansi sel bakteri tersebut. Penghambatan dalam pembentukan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis sel.

2.4.2.2 Menghambat fungsi membran sel

Sitoplasma suatu sel dibatasi oleh suatu membran yang berperan sebagai barier permeabilitas selektif, membran fungsi transpor aktif, dan juga mengontrol komposisi internal sel. Jika fungsi membran sel ini terganggu, maka komposisi internal sel tersebut akan keluar, sel menjadi rusak dan terjadilah kematian sel.

2.4.2.3 Menghambat sintesis protein

Suatu sel mengandung ribosom yang terdiri atas protein. Ribosom memiliki banyak tipe dengan komposisi dan fungsi yang berbeda. Apabila sintesis protein terganggu, maka juga akan mempengaruhi fungsi masing-masing tipe ribosom tersebut.

2.4.2.4 Menghambat sintesis asam nukleat

DNA atau RNA merupakan komponen yang paling penting di dalam sel. Terganggunya sintesis asam nukleat akan secara langsung menghambat pertumbuhan bakteri.

2.5 Metode Ekstraksi Bahan Alam

Ekstraksi adalah penarikan kandungan kimia dari simplisia (bahan alamiah nabati maupun hewani) dengan pelarut yang sesuai sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut (Ditjen POM, 2000). Tujuannya ialah mendapatkan atau memisahkan sebanyak mungkin zat yang memiliki khasiat pengobatan dari zat yang tidak bermanfaat agar lebih mudah digunakan dan disimpan (Syamsuni, 2006).

Pemilihan larutan pengestraksi harus mempertimbangkan banyak faktor. Larutan pengestraksi 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 pengestraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang diinginkan. Larutan pengestraksi yang digunakan yaitu etanol (Lifton, 2007).

Etanol adalah sejenis cairan yang mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna, dan merupakan alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Etanol banyak digunakan sebagai pelarut berbagai bahan kimia (Lifton, 2007). Selain etanol, aquades juga sering digunakan sebagai bahan pelarut karena dapat menghasilkan efek bakterisidal dan fungisidal. Tetapi bahan aktif yang dihasilkan tidak sebanyak yang dihasilkan oleh pelarut etanol (Krell, 1996).

Beberapa metode ekstraksi menurut Ditjen POM (2000) yaitu,

2.5.1 Cara Dingin

Ekstraksi dengan cara dingin memiliki keuntungan dapat memperkecil terjadinya kerusakan senyawa termolabil yang terdapat pada sampel bahan (Heinrich *et al.*, 2004). Ekstraksi dengan cara dingin meliputi,

2.5.1.1 Maserasi

Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Bahan simplisia dihaluskan dengan syarat farmakope (umumnya berupa serbuk kasar atau potongan-potongan kecil) kemudian disatukan dengan bahan pengestraksi. Cairan pelarut yang digunakan dapat berupa air, etanol, metanol, etanol-air atau pelarut lainnya. Cairan 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 didalam dan diluar sel. Maserasi kinetik di lakukan dengan pengadukan yang kontinu (terus menerus). Remaserasi dilakukan dengan pengulangan penambahan pelarut setelah di lakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya. Waktu lamanya maserasi berbeda-beda antara 4-10 hari. Keuntungan dari maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan relatif sederhana dan mudah diusahakan (Ditjen POM, 2000).

2.5.2.2 Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru dan sempurna yang dilakukan pada suhu ruangan. Prinsipnya, serbuk simplisia ditempatkan pada suatu bejana silinder yang pada bagian bawahnya terdapat sekat berpori. Proses perkolasi terdiri dari tahap pengembang bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan. Jika pada maserasi sederhana tidak terjadi ekstraksi sempurna karena

akan terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan dalam sel dengan cairan sekelilingnya, maka pada perkolasi perbedaan konsentrasi dapat dipertahankan. Dengan demikian ekstraksi total secara teoritis dimungkinkan (Ditjen POM, 2000).

2.5.2 Cara Panas

2.5.2.1 Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali.

2.5.2.2 Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik dengan pengadukan kontinu pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan yaitu pada temperatur 40-50°C.

2.5.2.3 Infus

Merupakan ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98 °C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

2.5.2.4 Sokletasi

Sokletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan dengan alat soklet sehingga terjadi ekstraksi kontinu dan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

2.5.2.5 Dekok

Dekok adalah ekstraksi dengan pelarut air pada waktu tertentu (selama 30 menit) dan pada temperatur 90-100°C.

2.6 Uji Kepekaan Bakteri

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode penyebaran (*diffusion method*) dan metode pengenceran (*dilution method*).

2.6.1 Metode Difusi

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan untuk mengukur aktivitas antibakteri. Menurut Kusmiyati dan Agustini (2006), metode difusi terdiri dari 3 cara,

2.6.1.1 Metode Difusi Lubang/Sumuran

Metode ini dikerjakan 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. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang.

2.6.1.2 Metode Difusi Silinder

Metode 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 diletakkan sedemikian rupa sehingga berdiri di atas media agar, lalu diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, diameter area hambatan di sekeliling silinder dihitung sebagai daya hambat terhadap uji bakteri.

2.6.1.3 Metode Difusi Cakram Kertas

Metode difusi cakram kertas sering disebut juga sebagai uji *Kirby-Bauer*. Tes ini dikerjakan dengan menggunakan cakram kertas saring yang mengandung bahan antimikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram yang telah diberi bakteri uji tersebut kemudian diletakkan di atas media padat. Setelah

diinkubasi, diameter area hambatan di sekeliling cakram dihitung sebagai daya hambat terhadap uji bakteri.

Keunggulan uji difusi cakram kertas mencakup fleksibilitas yang lebih besar dalam memilih obat yang akan diperiksa, kemudahan mengenali biakan campuran, dan biaya yang relatif murah. Tes ini mengukur kemampuan obat-obat untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Brooks *et al.*, 2007). Tes ini dikerjakan dengan menggunakan cakram kertas saring yang mengandung bahan antimikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram tersebut kemudian ditempatkan pada media padat yang telah diberi suspensi bakteri $0,1 \text{ ml } 10^8$ CFU/ml (Mahon *et al.*, 2014).

2.6.2 Metode Dilusi

2.6.2.1 Metode Dilusi Tabung

Metode ini digunakan untuk menentukan konsentrasi minimal, biasanya dalam mg/ml, suatu bahan antimikroba dibutuhkan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme tertentu dari suatu ekstrak. Prinsip dari metode ini ialah dengan menggunakan suatu seri tabung reaksi dan sejumlah bakteri yang diuji, kemudian masing-masing tabung diisi dengan bahan uji yang diinginkan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Kadar Hambat Minimal (KHM) dilihat dari konsentrasi minimal bahan uji yang mampu menghambat pertumbuhan koloni yang tampak pada *broth* (kekeruhan) secara nyata. Biakan dari seluruh tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat lalu diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Kadar Bunuh Minimal (KBM) dilihat dari tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada biakan padat dengan konsentrasi terendah bahan uji (Dzen *dkk.*, 2003).

2.6.2.2 Metode Dilusi Agar

Metode dilusi agar dapat digunakan untuk mengukur Kadar Hambat Minimal (KHM) namun tidak dapat mengukur Kadar Bunuh Minimal (KBM). Metode ini memanfaatkan media padat berupa agar yang diletakkan pada cawan petri, kemudian ditambahkan bahan uji antibakteri lalu dibiarkan mengeras dan disimpan di dalam kulkas dengan suhu 5°C sampai siap dipakai. Inokulum bakteri diteteskan pada agar pada hari dilakukannya perlakuan sekitar 0,001 ml dengan menggunakan pipet. Selanjutnya dilakukan inkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 16-18 jam kemudian dapat dilihat terdapat pertumbuhan bakteri atau tidak (Baron *et al.*, 1994).

2.7 Antibiotic susceptibility

Perawatan untuk pasien periodontitis agresif dengan infeksi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah *debridement*, *scaling* dan *root planning* serta terapi antibiotik. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* peka terhadap obat sefalosporin golongan ketiga (ceftriaxone, cefuroxime, cefixime, cefotazidime, cefepime), fluoroquinolon (ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin), tetrasiklin (tetrasiklin, doksisisiklin, minosiklin), azithromycin, rifampin dan aminoglikosida lainnya (Winn *et al.*, 2006).

Doksisisiklin termasuk dalam antibiotik golongan tetrasiklin. Antibiotik golongan tetrasiklin sendiri terdiri dari tetrasiklin, doksisisiklin dan minosiklin. Antibiotik golongan tetrasiklin merupakan antibiotik spectrum luas yang bersifat bakteristatik terhadap bakteri Gram negatif maupun Gram positif. Antibiotik golongan ini biasanya diberikan secara oral, meskipun terkadang juga dapat diberikan secara topikal. Antibiotik golongan ini diserap di *gastrointestinal tract* dan penyerapan dapat berkurang apabila konsumsi obat disertai dengan

konsumsi produk olahan susu atau substansi apapun yang mengandung kalsium, magnesium, iron atau alumunium (Pejčić *et al.*, 2010).

Faktor penting bagaimana doksisisiklin menjadi salah satu antibiotik yang efektif terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada periodontitis agresif adalah keberadaannya yang cukup tinggi pada *gingival crevice* dibandingkan antibiotik lain, yaitu 7-20 kali lebih banyak. Faktor kedua yang juga penting adalah mekanisme aksinya yang berupa antibakteri dan *host modulating properties* seperti: *anticollagenase*, *anti-inflammatory*, *inhibition of bone resorption*, *promotes reattachment*, *concept of low dose doxycycline (LDD)* dan *chemically modified tetracycline (CMT)* (Prakasam *et al.*, 2012).

