

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Saliva**

Saliva merupakan cairan yang sangat penting di rongga mulut yang dihasilkan oleh kelenjar saliva mayor dan minor. Hampir 99,5% saliva terdiri dari air dan sisanya adalah komponen organik, anorganik, dan komponen lainnya. Volume saliva yang disekresikan oleh kelenjar saliva sangat bervariasi dan tergantung pada stimulasi (Llena-Puy, 2006).

Jumlah volume saliva yang dihasilkan selama 24 jam secara normal adalah sekitar 0,5 sampai 1,5 liter per hari. Sekresi saliva dalam kelenjar diatur oleh saraf otonom, yakni saraf simpatis dan parasimpatis. Baik stimulasi simpatis maupun parasimpatis, keduanya meningkatkan sekresi saliva, tetapi jumlah, karakteristik, dan mekanisme yang berperan berbeda (Dawes, 2008).

Stimulasi simpatis menghasilkan volume saliva yang jauh lebih sedikit dengan konsistensi kental dan kaya mukus. Karena rangsangan simpatis menyebabkan sekresi saliva dalam jumlah sedikit, mulut terasa lebih kering daripada biasanya selama keadaan saat system simpatis dominan, misalnya pada keadaan stress. Stimulasi parasimpatis, yang berperan dominan dalam sekresi saliva menyebabkan pengeluaran saliva encer dalam jumlah besar dan kaya enzim (Sherwood, 2001).

2.1.1 Kelenjar Saliva

Kelenjar saliva mayor merupakan kelenjar saliva utama yang terdiri dari kelenjar parotid, kelenjar submandibular, dan kelenjar sublingual. Kelenjar parotis merupakan kelenjar saliva terbesar yang terletak di anterior dari aurikel telinga

dimana posisinya antara kulit dan otot masseter. Kelenjar parotis mengandung sejumlah besar enzim antara lain amilase liozime, fosfatase asam, aldolase, dan kolinesterase. Duktus ekskretoris utama kelenjar ini disebut duktus stenson yang terdiri dari epitel berlapis semu.

Kelenjar submandibularis merupakan kelenjar yang memproduksi saliva terbanyak dan mempunyai duktus ekskretoris yaitu duktus Whartoni yang bermuara pada dasar rongga mulut pada frenulum lidah, dibelakang gigi insisivus bawah. Kelenjar sublingualis mempunyai banyak duktus yang menyalurkan ke dalam rongga mulut. Duktus kelenjar ini disebut duktus Rivinus. Duktus ini terletak berdekatan dengan papilla dari duktus kelenjar submandibular (Fehrenbach, 2007).

Kelenjar saliva minor merupakan kelenjar kecil dalam jumlah banyak yang terletak di dalam mukosa atau submukosa. Kelenjar minor hanya menyumbangkan 5% dari sekresi saliva dalam 24 jam. Kelenjar-kelenjar ini diberi nama berdasarkan lokasinya atau nama pakar yang menemukannya.

Kelenjar labial (*glandula labialis*) terdapat pada bibir atas dan bibir bawah dengan asinus-asinus seromukus. Kelenjar bukal (*glandula bucalis*) terdapat pada mukosa pipi, dengan asinus-asinus seromukus. Kelenjar Bladin-Nuhn (*Glandula lingualis anterior*) terletak pada bagian bawah ujung lidah. Kelenjar Von Ebner (*Gustatory Gland = albuminous gland*) dan Kelenjar Weber terletak pada pangkal lidah. Kelenjar Von Ebner dan Weber disebut juga *glandula lingualis posterior* (Almeida *et al.*, 2008).

2.1.2 Komposisi Saliva

Saliva terdiri atas 99,5% air dan 0,5% substansi lainnya. Komposisi saliva terdiri dari komponen organik dan anorganik. Komponen organik yang terkandung di dalam saliva seperti urea, glukosa, asam amino, asam laktat dan

asam lemak. Makromolekul juga ditemukan di dalam saliva yakni protein (amilase, musin, histatin, cystatin, peroxidase, lisozim, dan laktoferin), dan immunoglobulin (IgA, IgM, dan IgG).

Komponen anorganik yang penting yang ditemukan di dalam saliva yaitu ion-ion seperti Ca, Mg, F, HCO₃, K, Na, Cl, NH₄. Selain itu, ada beberapa gas yang terdapat dalam saliva seperti CO₂, N₂, dan O₂. Saliva juga mengandung komponen yang lain seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF), insulin, *cyclic adenosine monophosphate binding protein*, dan serum albumin (Nanci, 2008).

Protein yang secara kuantitatif penting adalah α -Amilase, protein kaya prolin, musin dan immunoglobulin. Berikut adalah fungsi protein-protein dalam saliva:

- a. α -Amilase mengubah tepung kanji dan glikogen menjadi kesatuan karbohidrat yang kecil. α -Amilase dapat mempengaruhi polisakarida sehingga mudah dicerna.
- b. Lisozim mampu membunuh bakteri tertentu sehingga berperan dalam sistem penolakan bakterial.
- c. Kalikren dapat merusak sebagian protein tertentu, di antaranya faktor pembekuan darah XII, dan dengan demikian berguna bagi proses pembekuan darah.
- d. Laktoperosidase mampu menghambat pertumbuhan zat bakteri dan pertumbuhannya.
- e. Protein kaya prolin membentuk suatu kelas protein dengan berbagai fungsi penting yakni membentuk bagian utama pelikel muda pada email gigi.
- f. Musin membuat saliva menjadi pekat sehingga tidak mengalir seperti air yang disebabkan musin mempunyai selubung air dan terdapat pada semua permukaan mulut sehingga dapat melindungi jaringan mulut terhadap

kekeringan. Musin juga berfungsi untuk membentuk makanan menjadi bolus (Nanci, 2008).

2.1.4 Fungsi Saliva

Saliva mempunyai fungsi yang sangat penting untuk kesehatan rongga mulut karena mempunyai hubungan dengan proses biologis yang terjadi dalam rongga mulut. Fungsi saliva adalah sebagai berikut :

- (1) Sebagai cairan pelumas mempermudah proses menelan dengan membasahi partikel-partikel makanan sehingga saling menyatu serta dengan menghasilkan mukus yang kental dan licin, melapisi dan melindungi mukosa terhadap iritasi mekanis, kimiawi, termis, membantu kelancaran aliran udara, dan membantu dalam proses berbicara.
- (2) Sebagai cadangan ion-ion karena cairannya yang jenuh terutama dengan ion kalsium akan memfasilitasi proses remineralisasi gigi.
- (3) Berperan sebagai buffer yang membantu menetralkan pH plak sesudah makan, sehingga mengurangi waktu terjadinya demineralisasi serta mengatur pH rongga mulut tetap normal karena mengandung bikarbonat, fosfat, dan protein amfoter.
- (4) Sebagai pembersih sisa-sisa makanan dan membantu proses penelanan makanan.
- (5) Sebagai antimikroba dan juga mengontrol mikroorganisme rongga mulut secara spesifik misal dengan sIgA, dan non spesifik misal dengan adanya lisosim, laktoferin, sialoperoksidase.
- (6) Kemampuan aglutinasi dengan adanya agregasi dan mempercepat pembersihan sel - sel bakteri.

- (7) Membantu proses digestif (pencernaan makanan) dengan memecah polisakarida menjadi monosakarida dengan bantuan enzim amilase.
- (8) Membentuk pelikel yang berfungsi sebagai barier misalnya terhadap asam hasil fermentasi sisa - sisa makanan.
- (9) Berperan dalam pengecapan rasa, dapat melarutkan substansi pengecapan dari berbagai macam bentuk sifat fisik makanan baik padat maupun larutan. Substansi ini kemudian dibawa oleh saliva ke tempat sel reseptor pengecapan yang terdapat pada *taste buds*.
- (10) Ekskresi; secara teknis, rongga mulut langsung berhubungan dengan bagian luar tubuh, substansi yang disekresikan akan dibuang.
- (11) Keseimbangan air, dalam keadaan dehidrasi aliran saliva akan menurun, dan rongga mulut akan terasa kering (Del P et al, 2008).

2.1.5 pH (*Potential of Hidrogen*) Saliva

Susunan kuantitatif dan kualitatif elektrolit dalam saliva terutama susunan bikarbonat menentukan pH dan kapasitas buffer saliva. pH saliva normal berkisar antara 6,7-7,3. Derajat keasaman (pH) dan kapasitas buffer saliva dipengaruhi oleh beberapa faktor berikut:

a. Irama siang dan malam

pH saliva meningkat dan kemudian turun kembali dengan cepat pada keadaan istirahat atau segera setelah bangun. Seperempat jam setelah makan (stimulasi mekanik), pH saliva juga tinggi dan turun kembali dalam waktu 30-60 menit kemudian. pH saliva sedikit meningkat sampai malam, setelah itu turun kembali.

b. Diet

Diet kaya karbohidrat dapat menurunkan kapasitas buffer saliva dan meningkatkan metabolisme produksi asam oleh bakteri-bakteri mulut, sedangkan

diet kaya serat dan protein mempunyai efek meningkatkan buffer saliva dan meningkatkan sekresi zat-zat basa seperti amonia.

c. Rangsangan kecepatan sekresi

Hal ini berkaitan dengan ion bikarbonat yang meningkat jika terjadi peningkatan dari laju aliran saliva sehingga pH saliva meningkat.

d. Jenis kelamin

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, laju aliran saliva perempuan cenderung lebih rendah dibandingkan dengan pria. Hal ini disebabkan karena kelenjar saliva yang dimiliki perempuan lebih kecil jika dibandingkan dengan pria. Dengan demikian, pH saliva pada perempuan lebih rendah dibandingkan dengan pria.

e. Status psikologis

Penurunan kecepatan sekresi saliva saat keadaan tertekan sehingga menyebabkan penurunan pH saliva.

f. Usia

Kelenjar submandibula mengalami atrofi seiring bertambahnya usia sehingga sekresi saliva menurun dan terjadi penurunan pH saliva. Penurunan pH saliva akibat penuaan sangat kecil jika dibandingkan dengan penurunan akibat penyakit atau medikasi tertentu.

g. Perubahan hormonal

Perubahan hormon kelamin akan berubah saat wanita mengalami menopause. Hal ini menyebabkan sekresi saliva menurun sehingga pH saliva juga menurun.

h. Penyakit sistemik

Diabetes mellitus merupakan salah satu penyakit sistemik yang mempengaruhi produksi saliva. Penderita diabetes mellitus memiliki kelenjar saliva yang kurang dapat menerima stimulus sehingga mengurangi kemampuan kelenjar saliva untuk mensekresi saliva dan menyebabkan pH saliva turun.

i. Radioterapi

Pengobatan radioterapi dapat mengakibatkan rusaknya sel-sel sekresi kelenjar saliva sehingga dapat muncul gejala mulut kering, laju aliran saliva akan menurun, dan pH saliva pun menurun.

j. Medikasi tertentu

Ada beberapa obat yang dapat menyebabkan kekeringan pada rongga mulut, yaitu antidepresan, antipsikotik, antikolinergik, antihipertensi, hipnotik, diuretik, dan lain sebagainya. Kemoterapi dan obat-obatan sitotoksik yang berfungsi mengatasi malignansi biasanya juga menyebabkan gejala mulut kering yang akut (Almeida *et al.*, 2008).

2.1.6 Saliva Buatan dalam Kedokteran Gigi

Saliva buatan dalam kedokteran gigi mengandung campuran *buffering agent*, derivatif selulosa untuk meningkatkan keadaan saliva yang lembab dan lengket, dan *flavouring agent* seperti sorbitol. pH yang akan dihasilkan dari saliva buatan ini adalah 6.75 (Macknight-Hane dan Whitford, 1992). Berikut ini adalah komposisi dari saliva buatan:

Tabel 2.1 Komposisi Saliva Buatan (Macknight-Hane dan Whitford, 1992)

Larutan	Jumlah (gr/L)
<i>Methyl-p-hydroxybenzoate</i>	2
<i>Sodium carboxymethyl cellulose</i>	10
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.059
KCl	0.625
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.166
K ₂ HPO ₄	0.804
KH ₂ PO ₄	0.326

2.1.7 Hubungan pH Saliva terhadap Penyakit Periodontitis

Periodontitis merupakan inflamasi kronis yang disebabkan adanya infeksi bakteri pada jaringan periodontal yang terdapat dalam plak gigi, menyebabkan hancurnya jaringan tulang pendukung dan jaringan ikat (Tiara dkk., 2010). Bakteri yang berperan utama dalam periodontitis kronis adalah *Porphyromonas gingivalis*. *Porphyromonas gingivalis* dapat tumbuh optimum pada suhu 36.8-39°C dalam kondisi lingkungan pH antara 7.0-8.0 (Radiananda, 2008).

Saliva adalah salah satu *biomarker* dalam melakukan diagnosis penyakit periodontal. Perubahan pada pH saliva tidak berpengaruh langsung terhadap terjadinya periodontitis, berbeda dengan penyakit karies.

Berdasarkan penelitian Wiyatini (2009), responden yang mengalami periodontitis memiliki pH saliva basa. pH saliva yang basa berperan dalam pembentukan *calculus* dan menyebabkan terjadinya peradangan jaringan penyangga gigi.

Menurut Alves (2010), adanya aktivitas *Alkaline Phospatase* (ALP) dan konsentrasi urea meningkat pada keadaan pH saliva basa, dimana urea dimetabolisme secara cepat oleh bakteri dan enzim urease yang kemudian memproduksi amonia dan gas karbon yang akhirnya menyebabkan peningkatan pH saliva pada penyakit periodontitis kronis.

2.2 Penyakit Periodontal

Penyakit periodontal yang paling sering ditemukan pada manusia adalah gingivitis dan periodontitis. Penyakit tersebut merupakan respons inflamasi jaringan periodontal yang disebabkan oleh mikroorganisme pada plak gigi yang mengakibatkan destruksi jaringan periodontal (Wahyukundari, 2008).

Penyebab utama penyakit periodontal adalah iritasi plak bakteri. Plak atau yang juga dikenal dengan dental biofilm merupakan populasi dari mikroorganisme yang terdapat pada permukaan gigi yang dikelilingi oleh matriks ekstraselular yang dikenal dengan glikokaliks (Eley *et al.*, 2010).

2.3 Periodontitis

Periodontitis merupakan inflamasi kronis yang disebabkan adanya infeksi bakteri pada jaringan periodontal yang terdapat dalam plak gigi, menyebabkan hancurnya jaringan tulang pendukung dan jaringan ikat (Tiara dkk., 2010). Bakteri penyebab periodontitis adalah bakteri gram negatif, yaitu *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteriodes forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Camphylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, dan spesies *Treponema* dan *Eubacterium*. Klasifikasi periodontitis berdasarkan AAP *International Workshop for Classification of Periodontal Diseases* tahun 1999 dibagi menjadi periodontitis kronis, periodontitis agresif, dan periodontitis sebagai manifestasi penyakit sistemik (Carranza *et al.*, 2012).

2.3.1 Periodontitis Kronis

Periodontitis kronis merupakan penyakit periodontitis dengan tipe progresif yang lambat. Dengan adanya faktor sistemik seperti diabetes, perokok, stres, progres penyakit akan lebih cepat karena faktor tersebut dapat merubah respon host terhadap akumulasi plak. Periodontitis kronis adalah hasil dari respon host pada agregasi bakteri di permukaan gigi yang mengakibatkan kerusakan irreversibel pada jaringan perlekatan yang menghasilkan pembentukan poket periodontal dan kehilangan tulang alveolar pada akhirnya.

Adanya plak mikroba negatif gram yang berkolonisasi dalam sulkus gingiva (plak subgingiva) memicu respon inflamasi kronis. Sejalan dengan bertambah matangnya plak, plak menjadi lebih patogen dan respon inflamasi host berubah dari keadaan akut menjadi keadaan kronik. Adanya kerusakan jaringan periodontal akan ditandai dengan terdapatnya poket. Semakin dalamnya poket, semakin banyak terdapatnya bakteri subgingiva yang matang. Hal ini dikarenakan poket yang dalam terlindungi dari pembersih mekanik (penyikatan gigi) juga terdapat aliran cairan sulkus gingiva yang lebih konstan pada poket yang dalam dari pada poket yang diangkat.

Bakteri yang paling sering ditemukan pada penyakit periodontitis kronis (periodontitis berkembang lambat) dalam level yang tinggi meliputi *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Peptostreptococcus micros*, spesies *Treponema* dan *Eubacterium* (Putri, 2011).

2.3.2 Periodontitis Agresif

Periodontitis agresif adalah salah satu kelainan pada jaringan periodontal yang disertai dengan adanya *bone loss* secara progresif. Plak pada penderita periodontitis agresif biasanya hanya ditemukan dengan jumlah yang tidak sebanding dengan kerusakan tulang alveolar yang terjadi secara agresif. Plak yang ditemukan pada penderita periodontitis agresif di dominasi oleh bakteri *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Capnocytophaga spp.*, dan *Porphyromonas gingivalis* (Carranza et al., 2012).

2.3.3 Periodontitis sebagai Manifestasi Penyakit Sistemik

Kelainan hematologi dan genetik telah dihubungkan pada perkembangan periodontitis yang dapat mempengaruhi individu. Efek utama dari kelainan ini pada umumnya adalah melalui perubahan dari mekanisme pertahanan individu seperti pada penderita neutropenia dan penurunan leukosit. Manifestasi klinis pada beberapa kelainan tampak pada usia dini dan dapat tampak seperti periodontitis agresif dengan kehilangan *attachment* yang berlangsung cepat serta berpotensi kehilangan gigi.

Periodontitis sebagai manifestasi penyakit sistemik dapat didiagnosis ketika kondisi sistemik sebagai faktor predisposisi utama dan faktor lokal seperti banyaknya plak dan kalkulus. Jika terdapat destruksi periodontal yang jelas terlihat sebagai hasil dari faktor lokal tetapi telah mengalami eksaserbasi oleh pengaruh kondisi diabetes melitus atau infeksi HIV maka kasus tersebut didiagnosis sebagai periodontitis kronis dimodifikasi oleh keadaan sistemik. Periodontitis sebagai manifestasi penyakit sistemik diantaranya adalah (Carranza *et al.*, 2012):

1. Hematologi
 - a. *Acquired Neutropenia*
 - b. Leukemia
2. Genetik
 - a. *Familial and cyclic neutropenia*
 - b. *Down syndrome*
 - c. *Leukocyte adhesion deficiency syndroms*
 - d. *Papillon-Lefevre syndrome*
 - e. *Chediak-Higashi syndrome*
 - f. *Histiocytosis syndromes*

- g. *Glycogen storage diseases*
- h. *Infantile genetic agranulocytosis*
- i. *Cohen syndrome*
- j. *Ehlers- danlos syndrome*
- k. *Hypophosphatasia*

Tabel 2.2 Mikroorganisme yang berhubungan dengan periodontitis

Kondisi	Mikroorganismen dominan	Keterangan
Periodontitis kronis	<i>P.gingivalis</i>	Sekitar 75% gram negatif (90% anaerob). Terutama bakteri batang motil dan Spirocheta
	<i>P.intermedia</i>	
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
	<i>Tannerella forsythia</i>	
	<i>A.actinomycetemcomitans</i>	
	<i>Selenomonas sp.</i>	
	<i>Capnocytophaga spp.</i>	
Periodontitis agresif	<i>Spirochaetes</i>	Sekitar 65-75% bakteri basil gram negatif. Ditemukan sedikit spirokheta dan bakteri batang motil. Penyakit ini berhubungan dengan sistem imun seluler dan cacat genetik.
	<i>A.actinomycetemcomitans</i>	
	<i>Capnocytophaga spp</i>	
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
	<i>Prevotella intermedia</i>	

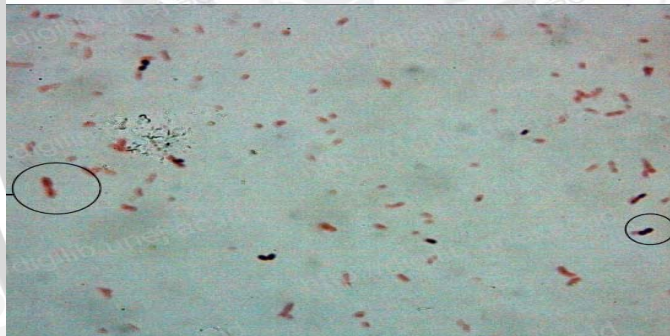
2.4 Porphyromonas gingivalis

Porphyromonas gingivalis semula disebut sebagai *Bacteroides gingivalis*, merupakan bakteri patogen utama pada penyakit periodontitis. Secara taksonomi, bakteri ini dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Nelson *et al.*, 2003) :

Kingdom : *Bacteria*
Phylum : *Bacterioedetes*
Class : *Bacterioedes*
Orde : *Bacteriodales*
Family : *Porphyromonadaceae*
Genus : *Porphyromonas*
Species : *Porphyromonas gingivalis*

2.4.1 Karakteristik

P. gingivalis berpigmen hitam dikarenakan akumulasi pigmen yang mengandung *haem/hemin* (iron protoporphyrin IX), pleomorfik terutama berbentuk batang pendek, *non-motil*, gram negatif, *non-fermentasi*, tidak membentuk spora, anaerob obligat, *asaccharolytic* atau proteolitik, dapat tumbuh optimum pada suhu 36.8-39°C dengan pH antara 7.0-8.0.



Bercak hitam hasil
metabolisme
hemin

Gambar 2.1 *Porphyromonas gingivalis* dengan pewarnaan Gram (Retno, 2012)

Pertumbuhan bakteri *P.gingivalis* dipengaruhi oleh adanya protein hidrolisat, seperti : tripsin, protease, pepton, dan *yeast extract*. Produk fermentasi yang utama adalah n-butirat dan asam asetat. Untuk tingkat yang lebih rendah juga diproduksi asam propionat, iso-butirat, fenil asetat, dan iso-valerik. Enzim

proteinase dan kolagenase juga diproduksi. Dinding sel peptidoglikan mengandung lisin sebagai asam diamino (Retno, 2012).

2.4.2 Metabolisme *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis membutuhkan hemin sebagai sumber zat besi dan peptide untuk pertumbuhan. Hemin diikat oleh bakteri pada permukaan sel dan seluruh molekul ditransportasikan ke dalam sel dengan mekanisme yang membutuhkan suatu energi. Hemin membantu bakteri untuk memecah protein sebagai produk akhir metabolik. Selain itu, bakteri ini bergantung pada substrat nitrogen sebagai sumber tenaga karena senyawa glukosa tidak dapat dikonversi menjadi produk akhir metabolik (Prathita, 2008).

2.4.3 Peranan *Porphyromonas gingivalis* pada Penyakit Periodontitis

P.gingivalis memiliki faktor virulensi fimbria, lipopolisakarida (LPS), proteinase, kapsul, hemaglutinin, vesikel membran dan metabolit organik seperti asam butirik serta berbagai enzim seperti arginin, lisin-gingipain, kolagenase, gelatinase dan hialuronidase, yang dapat berkontribusi dalam menginduksi penyakit periodontitis dalam rongga mulut dengan berbagai cara. *P. gingivalis* dapat membentuk koloni pada sulkus gingiva oleh karena peran fimbria.

Fimbria atau pili merupakan protein, filamen yang menonjol keluar dari permukaan sel bakteri dan memainkan peran penting dalam virulensi dengan merangsang perlekatan bakteri dengan sel epitel. Fimbria juga memiliki kemampuan yang kuat dalam berinteraksi dengan protein saliva, protein ekstraselular matriks, dan fibroblas.

LPS berperan sebagai agen sitotoksin dari bakteri yang dapat memicu respon inflamasi sel dan berbagai sinyal kemokin dari dalam tubuh manusia.

Rangsangan oleh LPS ini dapat mengakibatkan runtutan peristiwa inflamasi dan pertahanan tubuh manusia. LPS bersama fimbria, proteinase dan hemagglutinin berperan bersama-sama sebagai agen adheren terhadap rongga mulut.

Faktor virulensi proteinase dihasilkan oleh *P. gingivalis* untuk menghasilkan nutrisi untuk tumbuh. *P. gingivalis* membutuhkan asam amino, peptida dan hemin untuk tumbuh. Peptida dan hemin berpengaruh terhadap pertumbuhan dan termasuk komponen permukaan sel dan penyedia substrat untuk adhesi sel bakteri. Proteinase terlibat langsung dalam invasi dan merusak jaringan oleh bakteri, serta modulasi respon imun dalam tubuh manusia.

Enzim proteolitik *gingipain* dan kolagenase yang dihasilkan *P. gingivalis* dapat berperan secara langsung dan tidak langsung dalam merusak jaringan periodontal. Metabolit organik seperti amonia, propionat dan butirat juga menunjukkan kemampuan mengganggu sistem imun dan menunjukkan toksisitas terhadap epitel gingival.

P. gingivalis telah mengembangkan strategi adaptif untuk menyerang sel-sel epitel gingival. *P. gingivalis* melekat dan menyerang sel-sel epitel gingival dengan menargetkan reseptor spesifik host, memodulasi sinyal dan menderegulasi jaringan sitokin host. Efektor dari sistem kekebalan bawaan, sitokin proinflamasi, kemokin, MMPs (matriks metalloproteinases) dan peptida antimikroba diregulasi dan mungkin memiliki dampak langsung pada perkembangan penyakit dan proses peradangan, yang dapat berkontribusi terhadap kekebalan bakteri dan perkembangan manifestasi penyakit periodontitis kronis (Dwianggraini, 2012).

2.4.4 Identifikasi Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

Cara identifikasi yang dipakai adalah pemeriksaan secara mikroskopis menggunakan preparat ulas yang diberi pewarnaan Gram:

1. Biakan *Porphyromonas gingivalis* diambil sebanyak 1 ose yang telah dipanasi dan diletakkan ditengah-tengah *object glass*.
2. Biakan dicampur dengan 1-2 ose PZ di atas *object glass* dengan gerakan memutar dan melebar, kemudian sediaan dibiarkan mengering.
3. Sediaan difiksasi dengan larutan NaCl sebagai larutan pengencer konsentrasi bakteri.
4. Sediaan diwarnai dengan larutan *gentian violet* selama 1-3 menit. Setelah itu, dihilangkan dan dicuci dengan *lugol*.
5. Perendaman dalam *lugol* selama 60 detik. Setelah itu, direndam dengan alkohol 96% selama 10 detik sambil digoyang-goyangkan, dan dicuci dengan air mengalir.
6. Sediaan diwarnai dengan larutan *fuchsin* selama 60 detik, dicuci dengan air mengalir.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas saring atau *object glass* dapat dilewatkan di atas api.
8. *Object glass* ditetaskan minyak emersi untuk fiksasi.
9. *Object glass* kemudian dilihat di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x.
10. Hasil positif: Bakteri *Porphyromonas gingivalis* tercatat warna merah karena diwarnai oleh *fuchsin* (Gram negatif) (Prathita, 2008).

2.4.5 Uji Viabilitas *Porphyromonas gingivalis* pada Saliva Buatan

Viabilitas bakteri merupakan kemampuan untuk membentuk koloni bakteri pada media pertumbuhan baik yang berupa medium padat atau larutan. Penelitian yang telah dilakukan Riezki Dwianggraini tahun 2012 menunjukkan bahwa hemin, vitamin K, dan ekstrak ragi terbukti dapat menstimulasi pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* dalam media BHI-A dan BHI-B. Menurut Arslan *dkk* pada tahun 2009 dalam penelitiannya yang berjudul "The Effect of Lactoferrin on Oral Bacterial Attachment" menunjukkan bahwa *Porphyromonas gingivalis* dapat bertahan hidup dan berkembang di dalam media saliva buatan. Rangkaian uji viabilitas bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada media saliva buatan adalah:

- Sediakan satu tabung steril yang berisi BHI-B yang diperkaya *yeast extract*, vit. K, dan hemin kemudian diberi saliva buatan sebanyak 10 ml.
- Tabung tersebut ditandai sebagai tabung A. Tabung A ditambahkan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis*.
- Pengukuran pH saliva buatan pada kedua tabung sebelum diinkubasikan.
- Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dalam *anaerobic jar*.
- Pertumbuhan bakteri dalam media saliva buatan ditunjukkan dari kekeruhan yang terjadi pada tabung yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* dalam media saliva buatan.
- Pengukuran pH saliva buatan setelah diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C (Dwianggraini, 2012).

2.5 Media Tumbuh Bakteri

Media pertumbuhan mikroorganisme adalah suatu bahan yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Pertumbuhan dan perkembangan bakteri di pengaruhi oleh:

a. Temperatur

Pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh temperatur. Setiap mikroorganisme mempunyai temperatur optimum yaitu temperatur di mana terjadi kecepatan pertumbuhan optimal dan dihasilkan jumlah sel yang maksimal. Temperatur yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein sedangkan temperatur yang sangat rendah aktivitas enzim akan terhenti. Berdasarkan batas temperatur dibagi atas tiga golongan:

- psikofil: tumbuh pada temperatur -5° - 30°C dengan optimum 10° - 20°C .
- mesofil: tumbuh pada temperatur 10° - 45°C dengan optimum 20° - 40°C .
- termofil: tumbuh pada temperatur 25° - 80°C dengan optimum 50° - 60°C .

b. pH

pH optimum bagi kebanyakan bakteri terletak antara 6,5 dan 7,5. Namun ada beberapa mikroorganisme yang dapat tumbuh pada keadaan yang sangat asam atau alkali.

c. Tekanan osmosis

Osmosis merupakan perpindahan air melewati membran semipermeabel karena ketidakseimbangan material terlarut dalam media. Medium yang baik untuk pertumbuhan sel adalah medium isotonis terhadap sel tersebut. Dalam larutan hipotonik air akan masuk ke dalam sel sehingga menyebabkan sel membengkak, sedangkan dalam larutan hipertonik air akan keluar dari sel sehingga membran plasma mengerut dan lepas dari dinding sel (plasmolisis).

d. Oksigen

Berdasarkan kebutuhan oksigen di kenal mikroorganismenya di bagi menjadi 5 golongan yaitu:

- Anaerob obligat, hidup tanpa oksigen, oksigen toksik terhadap golongan ini.
- Anaerob aerotoleran, tidak mati dengan adanya oksigen.
- Anaerob fakultatif, mampu tumbuh baik dalam suasana dengan atau tanpa oksigen.
- Aerob obligat, tumbuh subur bila ada oksigen dalam jumlah besar.
- Mikroaerofilik, hanya tumbuh baik dalam tekanan oksigen yang rendah.

e. Nutrisi

Nutrisi merupakan substansi yang diperlukan untuk biosintesis dan pembentukan energi. Berdasarkan kebutuhannya, nutrisi dibedakan menjadi dua yaitu makroelemen yaitu elemen yang diperlukan dalam jumlah banyak dan mikroelemen yaitu elemen nutrisi yang diperlukan dalam jumlah sedikit (Friska, 2011).

2.5.1 Jenis Media Tumbuh Bakteri

Medium berdasarkan sifat fisik

- Medium padat adalah media yang mengandung agar 15% sehingga setelah dingin media menjadi padat
- Medium semi padat yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat, tidak begitu cair. Media semisolid dibuat dengan tujuan supaya pertumbuhan mikroba dapat menyebar ke seluruh media tetapi tidak mengalami pencampuran sempurna jika tergoyang.
- Medium cair yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (*Nutrient Broth*), LB (*Lactose Broth*), TSB (*Trypticase Soy Broth*).

Medium berdasarkan komposisi

- Medium sintetik: medium yang seluruh susunan kimia dan kadarnya telah diketahui dengan pasti. Contoh: *Glucose Agar* & *Mac Conkey Agar*
- Medium semi sintesis: medium yang sebagian komposisinya diketahui secara pasti. Contoh: PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang mengandung agar, dekstrosa dan ekstrak kentang.
- Medium non sintesis: medium yang dibuat dengan komposisi yang tidak dapat diketahui secara pasti dan biasanya langsung diekstrak dari bahan dasarnya. Contoh: *Tomato Juice Agar*, *Brain Heart Infusion Agar*, *Pancreatic Extract*.

Medium berdasarkan sifat

- Medium umum: medium yang umum digunakan untuk mengisolasi organisme dalam kultur murni. Contoh: *Nutrient Agar*
- Medium diperkaya: medium yang ditambah zat-zat tertentu (misalnya serum, darah, dan ekstrak tumbuhan) sehingga dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri tertentu
- Medium selektif: medium yang ditambah zat-zat tertentu yang bersifat selektif untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme lain
- Medium diferensiasi: medium ini bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba dari bakteri lainnya yang sama-sama tumbuh dalam media perbenihan berdasarkan karakter spesifik yang ditunjukkan pada media diferensial
- Medium penguji: medium dengan susunan tertentu yang digunakan untuk pengujian vitamin, asam amino, antimikroba dan sebagainya. Contoh: *Muller Hinton Agar* (Friska, 2011)

2.5.2 *Brain Heart Infussion (BHI)*

BHI adalah medium yang berguna untuk pertumbuhan berbagai macam bakteri baik bentuk cair maupun agar. *Brain Heart Infussion Agar (BHIA)* adalah medium yang direkomendasikan untuk penanaman bakteri patogenik, ragi/khamir, dan jamur. Komposisi dari BHIA adalah *infusion calf brain, infusion beef heart, proteosa pepton, dekstrosa, natrium klorida, disodium phosphate*, dan agar. *Brain Heart Infussion Broth (BHIB)* adalah media *Brain Heart Infussion* dalam bentuk cair. BHIB digunakan sebagai medium pertumbuhan bakteri anaerob, ragi/khamir, dan jamur dalam bentuk cair. Medium ini lebih buffer untuk berbagai variasi mikroorganismenya. Komposisi dari BHIA dan BHIB hampir sama yang membedakan keduanya adalah BHIB tidak mengandung agar (HimediaLab, 2011).

2.5.3 *Yeast Extract (Ekstrak Ragi)*

Protein merupakan sumber energi bagi bakteri yang bersifat *assacharolytic* atau proteolitik. Bakteri yang memiliki sifat proteolitik adalah bakteri gram negatif dan *Porphyromonas gingivalis* termasuk bakteri yang bersifat *assacharolytic* atau proteolitik (Dwianggraini, 2012).

Yeast extract dapat dimanfaatkan sebagai substrat yang sangat baik bagi pertumbuhan mikroorganismenya serta sumber produksi enzim dalam skala besar. *Yeast extract* merupakan salah satu protein hidrolisat yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *Yeast extract* mengandung asam amino yang lengkap & vitamin B kompleks sebagai media tambahan dalam isolasi bakteri *Porphyromonas gingivalis* (Suryono, 2009).

Tabel 2.3 Komposisi *Yeast Extract* (Kusnatul, 2002)

Zat	Komposisi
Nitrogen	8.8%
Protein	55%
NaCl	< 1%
Alanin	3.4%
Asam amino butirat	0.1%
Arginin	2.1%
Asparagin	3.8%
Cystin	0.3%
Asam glutamat	7.2%
Glisin	1.6%
Histidin	0.9%
Isoleusin	2.0%
Leusin	2.9%
Lysin	3.2%
Methionin	0.5%
Ortinin	0.3%
Fenilalanin	1.6%
Prolin	1.6%
Serin	1.9%
Threonin	1.9%
Tyrosin	0.8%
Valin	2.3%
Thiamin	20-30 ppm
Riboflavin	50-70 ppm
Piridoksin	25-35 ppm
Niasin	600 ppm
Asam panthotenat	200 ppm

2.6 Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Tanaman sirih mempunyai banyak spesies dan memiliki jenis yang beragam, seperti sirih jingga, sirih hitam, sirih kuning, sirih hijau dan sirih merah. Semua jenis tanaman sirih memiliki ciri yang hampir sama yaitu tumbuh merambat dan memiliki daun yang berbentuk seperti hati.

Sirih merah merupakan jenis sirih yang merambat dan banyak tumbuh di daerah tropis khususnya Indonesia. Sirih merah dapat tumbuh dengan baik di tempat yang teduh dengan ketinggian 300-1000 m dan mendapatkan 60 – 75 % cahaya matahari. Jika terkena sinar matahari langsung pada siang hari secara

terus menerus, warna merah daunnya bisa menjadi pudar dan batangnya akan cepat mengering (Duryatmo, 2005).



Gambar 2.2. Daun sirih merah (Dwiangraini, 2012)

2.6.1 Morfologi

a. Daun

Daun sirih merah memiliki daun berwarna hijau dengan tulang daun berwarna merah keperakan pada permukaan atas dan warna merah keunguan pada permukaan bawah daun. Daun menyerupai hati dengan bagian ujungnya runcing, permukaan daun mengkilat, tidak merata, dan tidak berbulu. Jika daunnya dirobek maka akan mengeluarkan lendir, terasa pahit, dan aromanya lebih wangi. Panjang daun kurang lebih 15-20 cm.

b. Batang

Batang berwarna hijau agak kemerahan dan permukaan kulitnya berkerut. Batang bersulur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm.

c. Akar

Bakal akar tumbuh di setiap buku batang. Akar tunggang dan bulat berwarna cokelat kekuningan (Sudewo, 2005).

2.6.2 Taksonomi

Kedudukan taksonomi sirih merah menurut Sudewo (2005) adalah sebagai berikut :

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Sub-kingdom</i>	: <i>Tracheobionta</i>
<i>Division</i>	: <i>Magnoliophyta</i>
<i>Sub-division</i>	: <i>Angiospermae</i>
<i>Class</i>	: <i>Magnoliopsida</i>
<i>Sub-class</i>	: <i>Magnolilidae</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Piperales</i>
<i>Family</i>	: <i>Piperaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Piper</i>
<i>Species</i>	: <i>Piper crocatum</i>

Kerabat dekatnya yaitu kisureuh, sirih, sirih hutan, kemekes, kemukus, mrico lolot, lada, cabe jawa, dan daun wati (Sudewo, 2005).

2.6.3 Kandungan Kimia dan Manfaat

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Puspitasari (dalam Juliantina, dkk, 2009), secara kromatografi sirih merah mengandung flavonoid, alkaloid senyawa polifenolat, tanin dan minyak atsiri. Senyawa – senyawa tersebut diketahui memiliki sifat antibakteri.

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bersifat koagulator protein. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Mekanisme fenol sebagai agen anti bakteri berperan sebagai toksin

dalam protoplasma, merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri.

Senyawa fenolik bermolekul besar mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel bakteri meskipun dalam konsentrasi yang sangat rendah. Fenol dapat menyebabkan kerusakan pada sel bakteri, denaturasi protein, menginaktifkan enzim dan menyebabkan kebocoran sel. Selain itu, flavonoid juga memiliki sifat antioksidan, antidiabetik, antifungi, antikanker, imunostimulan, antiseptik, antihepatotoksik, antihiperlipidemik, vasodilatator dan antiinflamasi (Juliantina, dkk, 2009).

b. Alkaloid

Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanismenya adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel bakteri (Juliantina, dkk, 2009).

c. Tanin

Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanisme yang diperkirakan adalah sebagai berikut: toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat mikroba, dan pembentukan suatu kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri (Juliantina, dkk, 2009).

Menurut Ajizah (dalam Juliantina, dkk, 2009) tanin diduga 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.

Menurut Masduki (dalam Juliantina, dkk, 2009) menyatakan bahwa tanin mempunyai daya aktivitas antibakteri dengan cara memprespipitasi protein karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik.

d. Minyak Atsiri

Mekanisme minyak atsiri sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna, selain itu pada minyak atsiri juga terdapat senyawa kavikol yang merupakan turunan dari fenol yang memiliki daya bunuh bakteri 5 kali lebih besar dari fenol (Vrita, 2014).

2.6.4 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat. Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu:

Cold Processing

1. Maserasi

Maserasi adalah proses perendaman simplisia dengan menggunakan pelarut dengan pengadukan beberapa kali selama 4-5 hari dan disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna). Cairan pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke

dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif dalam sel dan luar sel, maka larutan yang pekat dalam sel akan terdesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang hingga terjadi keseimbangan antara larutan di luar dan dalam sel.

Pengadukan tersebut membuat keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi lebih cepat dalam cairan. Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Maserasi digunakan untuk ekstraksi simplisia dengan zat aktif yang mudah larut dalam cairan pelarut, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam pelarut, dan tidak mengandung benzoin.

Cairan pelarut dapat berupa air, etanol, air-etanol, dan pelarut lain. Keuntungan dari maserasi adalah hasil ekstraksi banyak serta dapat menghindarkan perubahan kimia terhadap senyawa-senyawa tertentu oleh karena pemanasan namun demikian proses maserasi membutuhkan waktu yang relatif lama.

2. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses ini terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak)

Heat Processing

1. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik

2. Soxhlet

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya ekstraksi secara berkesinambungan. Cairan penyari dipanaskan sampai mendidih. Uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan

3. Infus

Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit (Prathita, 2008)

2.6.5 Efek Antibakteri Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*)

Daun sirih merah (*Piper crocatum*) memiliki daya antibakteri terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Daun sirih merah memiliki kandungan senyawa teriterpenoid, flavonoid, dan tanin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada kadar 25% dan *Escherichia coli* pada kadar 6.25% (Juliantina dkk., 2009).

Pada penelitian Vrita (2014), minyak atsiri dengan konsentrasi 0.727% pada ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Dalam kandungan minyak atsiri terdapat senyawa kavikol yang merupakan turunan dari fenol yang memiliki daya bunuh bakteri 5 kali lebih besar dari fenol.

2.7 Etanol

Etanol atau etil alkohol adalah alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari karena sifatnya yang tidak beracun. Etanol adalah

cairan jernih yang mudah terbakar dengan titik didih pada $78,4^{\circ}\text{C}$ dan titik beku pada -112°C . Etanol tidak berwarna dan tidak berbau tapi memiliki bau yang khas. Rumus molekul etanol adalah $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

Sifat kimia etanol adalah :

1. Merupakan pelarut yang baik untuk senyawa organik
2. Mudah menguap dan mudah terbakar
3. Bila direaksikan dengan asam halida akan membentuk alkyl halida dan air
4. Bila direaksikan dengan asam karboksilat akan membentuk ester dan air
5. Dehidrogenasi etanol menghasilkan asetaldehid
6. Mudah terbakar di udara sehingga menghasilkan lidah api (flame) yang berwarna biru muda dan transparan, dan membentuk H_2O dan CO_2 .

Sifat fisika etanol adalah:

1. Memiliki berat molekul $46,07 \text{ gr/gmol}$
2. Memiliki titik didih pada $78,4^{\circ}\text{C}$ dan titik beku pada -112°C
3. Dapat larut dalam air dan eter (Bangun, 2007)

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol 96% karena merupakan pelarut yang bersifat universal yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar sehingga diharapkan dengan menggunakan pelarut etanol 96% zat aktif yang diperlukan dapat tertarik sepenuhnya. Rendemen (Kadar ekstrak) yang dihasilkan bertambah tinggi dengan semakin tingginya konsentrasi alkohol. Dengan bertambahnya konsentrasi alkohol, polaritasnya semakin besar (Sundari, 2010).

2.8 Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri ditentukan oleh spektrum kerja (spektrum kerja luas, spektrum kerja sempit), cara kerja (bakterisida atau bakteriostatik) dan ditentukan

pula oleh Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) serta Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari antibakteri atau antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri tertentu. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari antibakteri terhadap bakteri digunakan untuk mengetahui sensitivitas dari bakteri terhadap antibakteri. Nilai KHM berlawanan dengan sensitivitas bakteri yang diuji.

Semakin rendah nilai KHM dari sebuah antibakteri, sensitivitas dari bakteri akan semakin besar (Jawetz, 2001). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minimal dari antibakteri yang dapat membunuh bakteri sebesar 99 % atau 100 % pada media yang digunakan. Dua metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan secara umum ialah metode difusi dan dilusi.

2.8.1 Metode Dilusi

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

a. Dilusi Tabung

Dilusi tabung digunakan untuk menentukan konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari suatu antibakteri. Prinsip dari metode ini yaitu menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah koloni bakteri yang akan diuji. Setiap tabung diisi dengan larutan antibakteri yang telah diencerkan, selanjutnya setiap tabung yang akan diuji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati terjadinya kekeruhan pada setiap tabung.

Konsentrasi terendah pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri) menunjukkan nilai KHM antibakteri tersebut. Biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasi pada media padat dan diinkubasi selama 24 jam. Tabung diamati untuk melihat ada

tidaknya bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah dari larutan antibakteri pada media padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni adalah nilai KBM antibakteri tersebut (Dzen dkk., 2003) .

b. Dilusi Agar

Metode dilusi agar pada prinsipnya sama dengan dilusi tabung, yang membedakan adalah pada dilusi agar menggunakan medium padat. Antibakteri dicampurkan ke dalam cawan petri berisi agar, kemudian agar dibiarkan mengeras dan disimpan dalam refrigerator pada suhu 5°C sampai siap dipakai. Metode ini hanya dapat digunakan untuk menentukan nilai KHM (Dzen dkk., 2003).

2.8.2 Metode Difusi

Metode difusi meliputi metode cakram (agar) atau metode Kirby Bauer dan metode sumuran. Metode difusi cakram menggunakan suatu cakram yang mengandung sejumlah antimikroba yang sudah distandarisasi ditempatkan pada cawan agar yang ditanami dengan bakteri yang akan diuji. Bakteri kemudian dibiarkan tumbuh dibawah kondisi yang benar-benar terkontrol sedangkan antibakteri berdifusi keluar menuju agar. Sedangkan metode difusi sumuran merupakan salah satu uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi, metode ini memiliki keunggulan lebih mudah digunakan, murah, dan praktis. Selain itu hasil pembacaan hasil juga lebih mudah dilakukan. Metode sumuran dilakukan dengan cara membuat lubang sumuran pada *petridisk* yang sudah terisi oleh media agar padat dan sudah diinokulasi dengan bakteri. Kemudian lubang sumuran diisi oleh larutan yang akan diuji. Hasil penelitian berupa zona hambat yakni daerah jernih di sekeliling lubang sumuran (Dzen, dkk., 2003).

2.9 Spektrofotometer

Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan rentang panjang gelombang sesuai dengan sumber cahaya. Dimana zat yang terdapat dalam sel sampel disinari dengan panjang gelombang tertentu, sehingga didapatkan ukuran suatu konsentrasi dari sampel tersebut. Ketika cahaya mengenai sampel, sebagian akan diserap, sebagian akan dihamburkan dan sebagian lagi akan diteruskan. Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (Prasetia, 2014).

Beberapa penelitian menggunakan nilai absorbansi untuk membuktikan banyaknya koloni bakteri yang terkandung dalam suatu media cair. Parameter yang diukur dalam metode ini adalah tingkat kekeruhan suatu media cair yang digunakan untuk sampel penelitian. Semakin besar nilai absorbansi maka semakin banyak bakteri yang terkandung dalam media cair tersebut (Lasmayanty, 2007).

