

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karies

2.1.1 Definisi Karies

Karies merupakan suatu penyakit pada jaringan keras gigi, yaitu enamel, dentin, dan sementum yang disebabkan aktifitas bakteri flora mulut yang ada dalam suatu karbohidrat yang diragikan (Pickard, 2002). Menurut Kamus Kedokteran Gigi karies didefinisikan sebagai suatu penyakit yang mengakibatkan demineralisasi, kavitasi, dan hancurnya jaringan keras gigi oleh aktivitas mikroba (Harty, 1995).

2.1.2 Etiologi Karies

Etiologi karies dimulai dari proses demineralisasi permukaan gigi dan akan berlanjut ke dalam lapisan gigi serta diikuti dengan kerusakan bahan organik (Brooks, 2007). Hal ini akan menyebabkan terjadinya invasi bakteri dan kerusakan pada jaringan pulpa serta penyebaran infeksi ke jaringan periapikal dan menimbulkan rasa nyeri (Pintauli & Hamada, 2008).

Faktor penting yang berperan dalam etiologi karies adalah *host*, mikroorganisme, substrat atau diet, dan waktu. Keempat faktor tersebut saling berkaitan dan bekerja sama dalam proses pembentukan karies gigi (Pickard, 2002).

2.1.3 Terapi dan Pencegahan Karies

Pencegahan karies gigi dilihat dari 4 etiologi karies yaitu *host*, diet, mikroorganisme dan waktu. Pencegahan melalui *host* dengan mengkonsumsi air minum berfluorida atau aplikasi fluorida lain, pencegahan selama fase post

erupsi, pemberian pelapis fisura, cairan untuk remineralisasi, restorasi gigi. Mikroorganisme melalui pengurangan jumlah bakteri *Streptococcus mutans*, dengan cara mengurangi konsumsi gula, dan imunisasi aktif atau pasif. Sedangkan pencegahan melalui waktu adalah dengan mengurangi frekuensi konsumsi sukrosa, menstimulasi aliran saliva dan pembersihan gula (Cawson, 2002).

Pengendalian diet dapat dilakukan melalui penggantian sukrosa dengan bahan pemanis lain seperti sakarin, aspartam atau xylitol. Selain itu juga dapat dilakukan pengendalian plak secara mekanik dengan sikat gigi atau secara kimia dengan menggunakan antiseptik. Pengendalian juga dapat dilakukan dengan perbaikan *life-style* seperti cara menyikat gigi yang salah, kebiasaan merokok, dan *bad habit* lainnya (Megananda et al., 2011).

2.2 Bakteri *Streptococcus*

2.2.1 Morfologi dan Karakteristik *Streptococcus*

Streptococcus merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat, yang mempunyai karakteristik dapat membentuk pasangan atau rantai selama pertumbuhannya. Bakteri ini tersebar di alam. Beberapa di antaranya merupakan anggota flora normal manusia, sedang *Streptococcus* yang lain berhubungan dengan penyakit pada manusia berupa infeksi. *Streptococcus* berbentuk bulat atau lonjong dengan diameter sekitar 0,8-1,0 μm . *Streptococcus* termasuk mikroorganisme gram positif, tidak berspora, tidak bergerak dan beberapa spesies membentuk kapsul. Spesies terbanyak dari *Streptococcus* bersifat fakultatif, yaitu dapat tumbuh dalam keadaan dengan oksigen maupun tanpa oksigen (Brooks et al., 2007; Forbes et al., 2007).

Streptococcus tumbuh dengan baik pada medium yang diperkaya, yaitu medium yang mengandung darah, serum, atau transudat misalnya cairan asites. Selain itu, pH yang dibutuhkan adalah 7,4-7,6 dengan suhu optimal 37°C. Terhadap panas sebaian *Streptococcus* mati pada suhu 5 °C selama 10 menit. Semua spesies *Streptococcus* mati pada suhu minimal 60°C selama ±30-60 menit, contoh pada pasteurisasi 62°C selama setengah jam (Dzen *et al.*,2003).

2.2.2 Klasifikasi *Streptococcus*

Selama bertahun-tahun, klasifikasi *Streptococcus* dikelompokkan menjadi beberapa kategori utama berdasarkan suatu seri yaitu morfologi koloni dan reaksi hemolitik pada agar darah, spesifisitas serologik dari unsur dinding sel golongan-spesifik dan dinding sel lain, reaksi biokimia dan resistensi terhadap faktor-faktor fisik, kimia dan sifat ekologiannya. Pada beberapa kasus nama spesies yang berbeda digunakan untuk menerangkan organisme yang sama dan di tempat lain beberapa anggota dari spesies yang sama juga meliputi spesies yang lain, atau yang diklasifikasikan secara terpisah (Dzen *et al.*, 2003).

Klasifikasi golongan *Streptococcus* dan *Enterococcus* berikut ini terutama memiliki relevansi medik yaitu *Streptococcus pyogenes*. Kebanyakan *Streptococcus* yang mengandung antigen golongan A adalah *Streptococcus pyogenes*. *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri patogen utama manusia yang berkaitan dengan invasi lokal atau sistemik dan gangguan imunologik setelah infeksi *Streptococcus*. Golongan yang kedua adalah *Streptococcus agalactiae* yang merupakan *Streptococcus* golongan B, merupakan anggota flora normal saluran genital dan penyebab penting dari sepsi neonates dan meningitis, golongan ketiga yaitu *Streptococcus* golongan C dan G. *Streptococcus* ini kadang-kadang muncul pada nasofaring dan dapat menyebabkan sinusitis,

bakteremia, atau endokarditis. Bakteri ini sering terlihat menyerupai *Streptococcus pyogenes* golongan A pada pembenihan agar darah dan bersifat β -hemolitik. Golongan keempat adalah *Enterococcus faecalis* yang bereaksi dengan antiserum golongan D. *Enterococcus* adalah bagian dari flora usus normal. Golongan kelima yaitu *Streptococcus bovis*, bakteri ini termasuk *Streptococcus* golongan D yang *non enterococcus*. Bakteri ini dapat menyebabkan endokarditis, dan kadang-kadang dapat menyebabkan bakteremia pada penderita karsinoma kolon. Golongan keenam adalah *Streptococcus anginosus*, bakteri ini adalah bagian dari flora normal yang dapat diklasifikasikan sebagai *Streptococcus viridans*. Golongan ketujuh yaitu *Streptococcus* golongan N, bakteri ini jarang ditemukan pada penyakit yang timbul pada manusia tetapi dapat menimbulkan koagulasi yang normal pada susu. Golongan kedelapan yaitu *Streptococcus* golongan E, F, G, H, dan K-U, bakteri ini tumbuh pada hewan daripada di manusia. Golongan kesembilan adalah *Streptococcus pneumonia*, bakteri ini bersifat α -hemolitik. Pertumbuhannya dihambat oleh optochin dan koloninya larut dalam empedu. Golongan kesepuluh yaitu *Streptococcus viridans* mencakup *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*. *Streptococcus* golongan ini merupakan anggota flora normal yang paling umum pada saluran pernapasan bagian atas dan berperan penting untuk menjaga keadaan normal mukosa. Bakteri ini dapat mencapai aliran darah akibat suatu trauma dan menyebabkan endokarditis pada katup jantung yang abnormal. Beberapa *Streptococcus viridans* (misalnya *Streptococcus mutans*) mensintesis polisakarida besar seperti dekstran atau levan dari sukrosa dan menjadi faktor penting pada pembentukan karies gigi, halitosis, dan berbagai penyakit periodontal. *Streptococcus mutans*

dapat membentuk koloni yang melekat dengan erat pada permukaan gigi dan lebih asidurik dibandingkan dengan *Streptococcus* yang lain. Golongan kesebelas yaitu *Streptococcus* varian secara nutrisi yaitu meliputi *Streptococcus defectivus* dan *Streptococcus adjacens* yang telah dikenal sebagai “*Streptococcus* defisiensi nutrisi”. Bakteri ini merupakan flora normal dan kadang-kadang menyebabkan bakteremia atau endokarditis, dapat ditemukan pada abses otak dan infeksi lain. Golongan bakteri kedubelas yaitu *Peptostreptococcus*, bakteri jenis ini hanya timbul pada situasi anaerob atau keadaan mikroaerofilik dan secara bervariasi membentuk hemოსilin bakteri ini adalah bagian dari flora normal mulut, usus, dan saluran genital pada wanita. Bersama dengan spesies bakteri lain seringkali ikut berperan dalam infeksi anaerob campuran di abdomen, pelvic, paru-paru, atau otak (Pintauli & Hamada, 2008).

2.2.3 Bakteri *Streptococcus mutans*

2.2.3.1 Klasifikasi

Kingdom	: <i>Monera</i>
Divisio	: <i>Firmicutes</i>
Class	: <i>Bacillus</i>
Order	: <i>Lactobacilalles</i>
Family	: <i>Streptococcaeae</i>
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Species	: <i>Streptococcus mutans</i> .

(Nugraha, 2008)

2.2.3.2 Morfologi Bakteri *Streptococcus mutans*

Sel bakteri *Streptococcus mutans* berbentuk bulat dan oval dengan diameter sekitar 2 milimikron dan merupakan kokus gram positif. Dalam koloni bakteri *Streptococcus mutans* berpasangan atau membentuk rantai bersama, tidak bergerak dan tidak membentuk spora. Pada pengkulturan mereka membentuk rantai panjang dan mempunyai metabolisme anaerob, namun mereka juga dapat hidup dalam fakultatif anaerob. Pada media solid mereka berbentuk kasar, runcing, dan berkoloni mukoid. Untuk pertumbuhannya bakteri *Streptococcus mutans* membutuhkan CO₂ jika diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Pada analisa DNA terdapat kandungan *Guanine* (G) dan *Cytosine* (C) yang sangat besar pada bakteri *Streptococcus mutans* karena secara genetis komposisi bakteri *Streptococcus mutans* sangat heterogen walaupun fenotifnya mirip (Regina, 2007).

Bakteri *Streptococcus mutans* bersifat asidogenik yaitu menghasilkan asam, dan asidodurik, yaitu mampu tinggal pada lingkungan asam, serta menghasilkan suatu polisakarida yang lengket yang disebut dekstran. Oleh karena kemampuan ini, bakteri *Streptococcus mutans* bisa menyebabkan lengket dan mendukung bakteri lain menuju ke email gigi, mendukung pertumbuhan bakteri asidodurik yang lainnya, dan menghasilkan asam yang melarutkan email gigi (Nugraha, 2008).



Gambar 2.1 Morfologi Bakteri *Streptococcus mutans* Secara Mikroskopis Tampak Kokus Gram Positif Membentuk Seperti Rantai (Berwarna Ungu) (Nugraha, 2008)

2.2.3.3 Peran Bakteri *Streptococcus mutans* dalam Pembentukan Karies

Karies merupakan penyakit infeksi kronis yang paling umum mempengaruhi anak-anak dan dewasa di seluruh dunia. Etiologi dan patogenesis karies pada manusia dikaitkan dengan bakteri yang berkoloni pada permukaan gigi yaitu bakteri *Streptococcus mutans*. Kemampuan bakteri ini untuk mensintesis glukan ekstraseluler dari sukrosa dengan menggunakan enzimnya (*glucosyltransferase*) merupakan faktor utama dalam virulensi karies. *Glucosyltransferase* yang disekresi oleh bakteri *Streptococcus mutans* sering berikatan dengan partikel pada permukaan gigi dan pada permukaan mikroorganisme lain. Glukan yang tidak larut disintesis oleh permukaan *Glycotransferase-B* (GtfB) dan *Glycotransferase-C* (GtfC) yang terabsorpsi menyediakan sisi pengikatan spesifik untuk kolonisasi bakteri pada permukaan gigi dan bakteri satu sama lain, mengatur pembentukan biofilm yang sangat erat. Jika biofilm tetap berada pada permukaan gigi dan dilindungi oleh makanan berkarbohidrat terutama sukrosa, bakteri *Streptococcus mutans* sebagai bagian dari komunitas biofilm akan melanjutkan sintesis polisakarida dan memetabolisme gula menjadi asam organik. Jumlah yang tinggi dari polisakarida

ekstraseluler meningkatkan stabilitas biofilm dan integritas struktural dan melindungi bakteri terhadap pengaruh buruk dari antimikroba dan pengaruh lingkungan. Kemampuan bakteri *Streptococcus mutans* untuk memanfaatkan beberapa ekstra dan intraseluler sebagai senyawa penyimpanan jangka pendek menawarkan keuntungan ekologis tambahan, bersamaan dengan peningkatan jumlah produksi asam dan tingkat keasaman. Ketahanan lingkungan asam ini menyebabkan flora toleran terhadap asam yang tinggi, lingkungan dengan pH yang rendah dalam matriks plak hasil demineralisasi pada enamel, demikian permulaan proses karies gigi. Oleh karena itu, polisakarida ekstraseluler dan pengasaman dari biofilm sangat penting untuk pembentukan plak gigi kariogenik (Murata, 2010).

Streptococcus kariogenik mempunyai sifat-sifat tertentu yang memegang peranan utama dalam proses karies gigi, yaitu:

- a) *Streptococcus* memfermentasi berbagai jenis karbohidrat menjadi asam sehingga mengakibatkan turunnya pH.
- b) *Streptococcus* membentuk dan menyimpan polisakarida intraseluler dari berbagai jenis karbohidrat dan polisakarida. Simpanan ini dapat dipecah kembali oleh bakteri tersebut jika karbohidrat eksogen berkurang, sehingga asam akan terbentuk terus-menerus.
- c) *Streptococcus* mempunyai kemampuan untuk membentuk polisakarida ekstraseluler (dekstran dan levan) yang menghasilkan sifat adhesif dan kohesif dari plak.

Dari peranan bakteri *Streptococcus mutans* tersebut, proses pembentukan karies gigi sangat dipengaruhi oleh proses terbentuknya

polisakarida dari bakteri yang akan meningkatkan proses demineralisasi sehingga terjadi karies atau lubang pada gigi (Megananda *et al.*, 2011).

2.3 Cuka Kurma

2.3.1 Definisi

Cuka adalah sejenis bumbu yang dibuat dengan melakukan fermentasi alkohol dan asetikasi dari beberapa bahan yang mengandung gula dan pati. Bakteri yang digunakan untuk membuat cuka adalah dari genus *Acetobacter* yang mempunyai kemampuan untuk mengubah ethyl alcohol (C_2H_5OH) menjadi asam asetat (CH_3CO_2H) melalui proses oksidasi. Cuka dapat dibuat dari berbagai bahan mentah, seperti alkohol distilasi, minuman anggur, sari buah dan berbagai larutan beralkohol (Matloob & Hamza, 2013).

Cuka mengandung asam asetat. Asam asetat dilaporkan mempunyai efek fisiologis, seperti efek antihipertensi, mengembalikan jumlah glikogen dalam hati dan otot, serta mengurangi serum kolesterol dan triacylglycerol. Pada cuka yang terbuat dari sari buah, terdapat komposisi yang tergantung dari buah yang menjadi bahan dasar cuka (Matloob & Hamza, 2013).

Salah satu buah yang menjadi bahan dasar cuka adalah kurma (*Phoenix dactylifera*) (Chandrasekaran & Bahkali, 2013). Kurma adalah buah yang sudah tersebar di seluruh dunia sejak lama, sehingga asalnya yang sesungguhnya tidak diketahui, namun diperkirakan berasal dari sekitar oase Afrika Utara dan Asia Barat. Kurma memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi, asam lemak, mineral, protein, vitamin dan serat. Kurma juga mengandung fluorin yang dapat mencegah kerusakan gigi dan selenium yang dipercaya dapat menghambat kanker dan menjaga imunitas. Walaupun kurma mengandung banyak nutrisi

yang dapat mendukung pertumbuhan mikroorganisme, kurma dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama pada keadaan normal tanpa menunjukkan tanda-tanda pertumbuhan mikroba. Hal ini yang menunjukkan bahwa kurma memiliki agen antibakteri dan antifungal yang dapat mencegah kontaminasi mikroba (Al-Seeni, 2012).



Gambar 2.2 Pohon Kurma (*Phoenix dactylifera*) (Cooper, http://plants.usda.gov/java/largeImage?imageID=phda4_001_ahp.tif)

Cara pembuatan cuka kurma adalah dengan menggunakan kurma yang sudah matang. Buah kurma lalu dicuci, dipisahkan dengan bijinya, dipotong menjadi bagian-bagian yang kecil lalu dilakukan ekstraksi dengan air distilasi pada suhu 70°C. Setelah itu, sari buah kurma dimasukkan ke dalam botol dan diinokulasikan dengan bakteri atau ragi. Selanjutnya, sari buah yang telah berfermentasi diasetifikasi, yaitu dengan menambahkan cuka lama dengan perbandingan 1:10. Fermentasi dianggap sudah selesai ketika kandungan gula telah berkurang (<0,5% w/v) dan konsentrasi ethanol sudah di bawah 0,50% w/v (Matloob, 2014).

Belum ada penelitian yang menjelaskan hubungan atau efek samping dari cuka kurma terhadap gigi, namun paparan asam asetat dapat berdampak erosi

terhadap gigi pada pekerja di instansi farmasi dan bioteknologi (Wiegand & Attin, 2007).

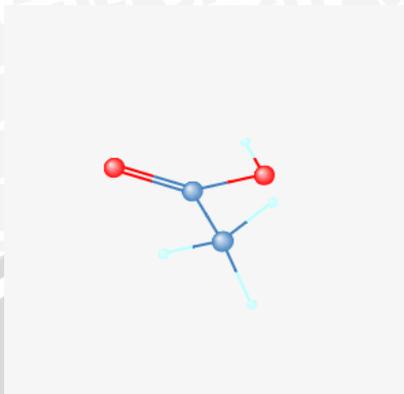
2.3.2 Kandungan Cuka Kurma

Cuka kurma mengandung beberapa asam organik, seperti asam asetat, asam askorbat, asam benzoat, asam malat, asam format, asam oksalat, asam suksinat dan asam tartarat. Di antara senyawa-senyawa tersebut, asam asetat, asam benzoat dan asam malat memiliki konsentrasi yang tinggi di dalam cuka kurma (Cherif *et al.*, 2014; Alabbasy *et al.*, 2013; Matloob, 2014). Kandungan tersebut memiliki efek antibakteri (Ewadh *et al.*, 2013; Adeshina & Onaolapo, 2012; Davidson *et al.*, 2005).

2.3.2.1 Asam Asetat

Asam asetat adalah komponen organik yang bersifat asam. Komponen asam organik yang paling umum adalah carboxylic acid, yang keasamannya berhubungan dengan grup carboxyl (Ewadh *et al.*, 2013).

Asam asetat digunakan sebagai pengawet makanan karena kemampuan antibakterinya. Kunci mekanisme asam asetat adalah penetrasi dinding sel dan mengganggu fisiologi normal bakteri (Ewadh *et al.*, 2013). Asam ini berdifusi pasif melalui dinding sel bakteri dan terdisosiasi menjadi anion dan proton. Pelepasan proton menurunkan tingkat pH internal bakteri yang mengakibatkan efek menghambat pertumbuhan bakteri (Cherif *et al.*, 2014).



Gambar 2.3 Struktur Asam Asetat (National Center for Biotechnology Information, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetic_acid#section=Top)

Keterangan:

Lingkaran warna biru tua: atom karbon

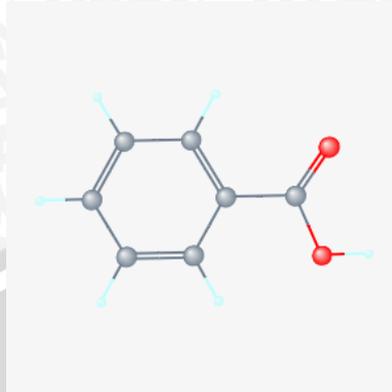
Lingkaran warna biru muda : atom hidrogen

Lingkaran warna merah : atom oksigen

2.3.2.2 Asam Benzoat

Asam benzoat adalah senyawa yang secara alami diproduksi oleh berbagai tumbuhan sebagai phytoalexin yang berfungsi sebagai pelindung tumbuhan dari serangan patogen (Wibbertmann *et al.*, 2005; Martínez, 2012).

Asam benzoat pertama kali dikenal sebagai antifungal. Senyawa ini banyak digunakan sebagai pengawet untuk makanan dan obat-obatan, namun dapat terinaktivasi dengan cepat pada pH di atas 5. Selain sebagai antifungal, asam benzoat juga terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus* spp. (Fraise *et al.*, 2008).



Gambar 2.4 Struktur Asam Benzoat (National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/243#section=Top>)

Keterangan:

Lingkaran warna biru tua: atom karbon

Lingkaran warna biru muda : atom hidrogen

Lingkaran warna merah : atom oksigen

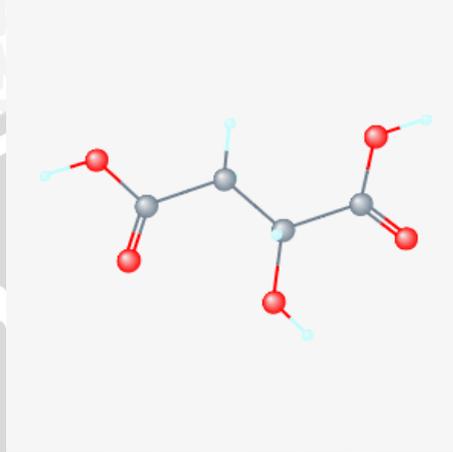
Efek antibakteri asam benzoat ditimbulkan dari kemampuannya untuk mengurai substrat transport dan *oxidative phosphorylation* dari sistem transport dengan cara membuat membran sitoplasma dapat ditembus dengan mudah oleh proton yang menyebabkan terganggunya keseimbangan pH bakteri (Adeshina & Onalapo, 2012; Cherif *et al.*, 2014). Studi menunjukkan bahwa sifat lipofilik dan besar konstanta keasaman yang dimiliki asam benzoat dan turunannya adalah faktor yang penting yang mempengaruhi efektivitas (Fraise *et al.*, 2008).

2.3.2.3 Asam Malat

Asam malat adalah asam organik yang terdapat di buah-buahan, contohnya jenis buah beri-berian (Patra, 2012).

Asam malat dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur dengan cara mempengaruhi tingkat pH. Asam malat dapat menghambat pertumbuhan

Staphylococcus aureus dan juga mempengaruhi permeabilitas *Salmonella* (Davidson *et al.*, 2005; Patra, 2012).



Gambar 2.5 Struktur asam malat (National Center for Biotechnology Information, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/525#section=Top>)

Keterangan:

Lingkaran warna biru tua: atom karbon

Lingkaran warna biru muda : atom hidrogen

Lingkaran warna merah : atom oksigen

Cara kerja antibakteri asam malat adalah dengan mengubah keseimbangan asam-basa, penambahan proton dan mempengaruhi produksi energi sel, sebagaimana mekanisme asam organik pada umumnya dengan cara berpenetrasi ke dalam sel bakteri dan merusak sitoplasma (Davidson *et al.*, 2005; Rathnayaka, 2013). Sistem biologis dan kimiawi bergantung kepada sistem asam dan basa. Sel mikroba biasanya mengatur keseimbangan pH sel sehingga pH sel mendekati pH netral. Homeostasis adalah kecenderungan pada suatu sel untuk mempertahankan keseimbangan kimiawi walaupun terdapat fluktuasi suasana asam-basa. Melalui interaksi suatu rangkaian mekanisme kimiawi, keseimbangan yang lemah ini terjaga dan jika terjadi perubahan pada keseimbangan ini akan menyebabkan destruksi sel mikroba. Protein, asam

nukleat, dan phospholipid dapat mengalami perubahan struktur dikarenakan perubahan pH. Ketersediaan ion metalik pada organisme juga akan berubah dan menyebabkan permeabilitas membran karena membran lebih sulit untuk ditembus pada molekul yang bermuatan dibandingkan dengan molekul yang tidak bermuatan. Perubahan-perubahan pada permeabilitas membran dapat mengakibatkan efek dengan mengganggu transport nutrisi menuju sel atau menyebabkan kebocoran metabolit. Perubahan pH dapat menghancurkan bakteri, jamur dan ragi (Davidson *et al.*, 2005).

2.4 Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa kimia yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Bahan antibakteri yang baik adalah bahan yang efektif dalam membunuh kuman tetapi tidak mengiritasi jaringan sekitarnya (Newman, 2001).

Antibakteri terdiri dari dua macam, yaitu antiseptik dan desinfektan. Antiseptik merupakan bahan yang digunakan untuk menghambat perkembangbiakan bakteri (bakteriostatik) sedangkan desinfektan tidak hanya menghambat bakteri namun juga membunuh bakteri dengan cara menghancurkan dinding selnya (bakteriosidik) (Katzung, 2001). Antibakteriostatik menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan bakterisida sebenarnya membunuh bakteri, perbedaan ini biasanya tidak penting secara klinis selama pertahanan penjamu terlibat dalam eliminasi akhir patogen bakteri.

Bakteriostatik memiliki kemampuan menghambat bakteri. Perkembangbiakan akan berlangsung bila zat antibakteri telah tidak ada. Bakteriosidik memiliki sifat mematikan bakteri, bakteri tidak dapat pulih lagi,

dimana bakteri yang sudah dimatikan tidak dapat berkembangbiak meskipun tidak terkena zat antimikroba (Jawetz *et al.*, 1996).

Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas *in vitro* antara lain pH lingkungan, komponen media, stabilitas obat, suhu, ukuran inokulum, waktu inkubasi dan aktivitas metabolik bakteri (Tanu, 2007).

Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba dikenal sebagai kadar hambat minimal (KHM) sedangkan kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh mikroba dikenal sebagai kadar bunuh minimal (KBM). Antibakteri tertentu dapat meningkat efektivitasnya dari bakteriostatik menjadi bakteriosidik bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi kadar hambat minimum (Setiabudy, 2009).

2.4.1 Mekanisme Kerja Antimikroba

Mekanisme kerja antimikroba dalam menghambat dan membunuh mikroorganisme terdiri dari 5 kelompok, yaitu: (1) mengganggu metabolisme sel mikroba, (2) menghambat sintesis dinding sel mikroba, (3) mengganggu permeabilitas membran sel mikroba, (4) menghambat sintesis protein sel mikroba, dan (5) menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba (Setiabudy, 2009).

Mekanisme kerja yang pertama yaitu menghambat metabolisme sel mikroba. Mikroba membutuhkan sama folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, mikroorganisme harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila suatu agen mikroba menang bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog

asam folat yang nonfungsional. Akibatnya, kehidupan mikroba akan terganggu (Setiabudy, 2009).

Mekanisme kerja yang kedua yaitu menghambat sintesis dinding sel mikroba. Dinding sel bakteri, terdiri dari peptidoglikan, yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antimikroba dapat menghambat sintesa dinding sel mikroba yaitu dengan menghambat pertumbuhan peptidoglikan. Ketika aktivitas antimikroba menyebabkan tekanan osmotik dalam sel mikroorganisme lebih tinggi daripada di luar sel maka terjadilah kerusakan dinding sel mikroorganisme yang pada akhirnya dapat menyebabkan terjadinya lisis (Setiabudy, 2009).

Mekanisme kerja yang ketiga yaitu mengganggu keutuhan membran sel mikroba. Senyawa antimikroba dapat menyerang membran sitoplasma dan mempengaruhi integritasnya (Pelczar & Chan, 2005). Kerusakan pada membran sitoplasma mengakibatkan peningkatan permeabilitas dan terjadi kebocoran sel yang diikuti dengan keluarnya intraseluler seperti protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Setiabudy, 2009).

Mekanisme kerja yang keempat yaitu menghambat sintesis protein sel mikroba. Untuk kehidupannya, sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada mikroba, ribosom terdiri atas dua sub unit yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Agar berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini perlu bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara. Senyawa antimikroba mampu menghambat sintesis protein bakteri yaitu senyawa tersebut dapat berikatan dengan komponen sel ribosom 30S yang

menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akhirnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba (Setiabudy, 2009).

Mekanisme kerja yang kelima yaitu menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba. Senyawa antimikroba ini akan berikatan dengan enzim polimerase RNA sehingga menghambat enzim DNA oleh enzim tersebut. Senyawa antimikroba ini juga menghambat enzim DNA girase yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga dapat dimuat pada sel (Setiabudy, 2009).

2.5 Uji Antibakteri

Uji kepekaan mikroba terhadap suatu antimikroba bertujuan untuk mengetahui apakah antimikroba masih dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh mikroba tersebut. Uji kepekaan terhadap antimikroba dapat dilakukan secara *in vitro* melalui beberapa cara, yang dibagi secara garis besar menjadi 3 cara, yaitu metode dilusi, metode difusi, dan metode *thin-layer chromatography* (TLC)-*bioautography* (Balouiri *et al.*, 2015).

2.5.1 Metode Dilusi

Metode dilusi digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) suatu antimikroba (Dzen *et al.*, 2003).

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

2.5.1.1 Metode Dilusi Tabung

Menggunakan satu seri tabung reaksi dan sejumlah sel bakteri yang diuji, kemudian masing-masing tabung diisi ekstrak/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/obat terhadap bakteri uji (Dzen *et al.*, 2003).

2.5.1.2 Metode Dilusi Agar

Terdapat cara lain apabila Kadar Hambat Minimum (KHM) dengan metode dilusi tabung tidak terlihat tingkat kekeruhannya, yaitu menggunakan cara dilusi agar. Penggunaan metode dilusi agar, cawan yang telah disterilisasi diisi dengan volume yang disesuaikan dari agen antimikroba dan ditambahkan agar cair dengan suhu 42-45°C, dituangkan ke dalam cawan petri bulat atau persegi dan dibiarkan mengeras (Jorgensen *et al.*, 1999).

Cara untuk menentukan antimikroba dengan menempatkan cawan pada latar belakang gelap dan memeriksa cawan untuk melihat pertumbuhan yang terhambat pada konsentrasi terendah, yang dicatat sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM). Apabila pertumbuhan pada inokulum koloni tunggal atau tingkat kekeruhannya samar maka tidak dianggap sebagai pertumbuhan. Kelebihan dari

pengujian dengan metode dilusi agar, yaitu pengujian metode ini dapat digunakan sebagai referensi untuk mengevaluasi secara akurat dibandingkan dengan metode pengujian lainnya. Selain itu, pengujian yang berkelanjutan dari sejumlah isolat yang hanya menggunakan sedikit obat lebih efisien dan terjadinya kontaminasi lebih mudah terdeteksi dengan metode dilusi agar daripada metode dilusi tabung (Jorgensen *et al.*, 1999).

2.5.2 Metode Difusi

Metode ini dipengaruhi beberapa faktor fisik dan kimia, selain faktor antara obat dan mikroorganisme (misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat). Standardisasi pada faktor-faktor tersebut memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik (Brooks *et al.*, 2005).

2.5.2.1 Metode Difusi Cakram/Disk

Prinsip metode ini adalah kertas cakram direndam dalam obat/antimikroba hingga jenuh. Kertas cakram yang mengandung obat tertentu ditanam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang diuji, kemudian diinkubasikan 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih di sekitar kertas disk yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba. Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolat mikroba sensitif atau resisten terhadap obat) dapat dilakukan dua cara seperti berikut ini (Dzen *et al.*, 2003):

2.5.2.1.1 Cara Kirby Bauer

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

NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Dengan tabel NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif *intermediet* dan resisten (Dzen *et al.*, 2003).

2.5.2.1.2 Cara Joan-Stokes

Dilakukan dengan membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Cara Joan-Stokes, prosedur kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen *et al.*, 2003).

2.5.2.4 Metode Antimicrobial Gradient (Etest)

Metode ini menggabungkan prinsip metode dilusi dengan difusi dengan tujuan untuk mengetahui kadar KHM. Hal ini didasari dengan memungkinkannya membuat gradien konsentrasi dari agen antimikroba yang akan diuji pada media agar. *Etest*® (BioMérieux) adalah versi komersial dari teknik ini. Prosedurnya adalah sebuah *strip* yang sudah mengandung bahan antimikroba dengan gradien konsentrasi yang semakin tinggi dari satu ujung ke ujung yang lain diletakkan pada permukaan agar yang sudah diinokulasikan dengan mikroorganisme uji. Kadar KHM diketahui dengan melihat pertemuan *strip* dan elips yang terbentuk dari zona hambat (Balouiri *et al.*, 2015).

2.5.2.5 Metode Difusi Sumuran

Metode difusi sumuran digunakan secara luas untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba dari tanaman. Seluruh permukaan agar diinokulasi dengan inokulum mikroba dengan disebar atau dengan dicampur dengan media agar

(Balouiri *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2015). Lalu, lubang berdiameter 6 sampai 8 mm dibuat secara aseptik dan agen antimikroba sebanyak 20 sampai 100 μ l dengan konsentrasi yang diinginkan diaplikasikan ke dalam lubang sumuran. Selanjutnya agar diinkubasi sesuai dengan kondisi yang sesuai dengan mikroorganisme uji (Balouiri *et al.*, 2015).

2.5.2.6 Metode Difusi Agar Plug

Metode ini biasanya digunakan untuk menonjolkan antagonis di antara mikroorganisme. Prosedur *agar plug* sama dengan metode difusi cakram. Kultur agar mikroorganisme yang akan diuji dibuat pada media kultur yang sesuai dengan cara digoreskan. Selama mikroorganisme tumbuh, sel mikroba akan mengeluarkan molekul yang akan berdifusi ke dalam media agar. Setelah inkubasi, sebuah *agar-plot* atau silinder agar diambil secara aseptik dan ditaruh pada *plate* lain yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme uji yang lain. Substansi dari *plug* akan berdifusi ke media agar. Selanjutnya, aktivitas antimikroba dari molekul yang disekresi oleh mikroba dapat diamati dengan adanya zona hambat di sekitar *plug* (Balouiri *et al.*, 2015).

2.5.2.7 Metode Cross Streak

Metode *cross streak* digunakan untuk mengamati antagonis mikroorganisme dengan cepat. Mikroba yang akan diamati digoreskan sekali di tengah agar. Setelah inkubasi, agar diinokulasi dengan mikroorganisme uji dengan sekali goresan secara 90 derajat dengan goresan yang di tengah agar. Setelah diinkubasi lagi, interaksi antimikroba dapat dilihat dengan mengamati zona hambat yang terbentuk (Balouiri *et al.*, 2015).

2.5.3 Metode *Thin-layer Chromatography* (TLC)-*bioautography*

Pada tahun 1946, Goodall dan Levi menggabungkan metode kromatografi kertas (*paper chromatography* atau PC) dengan *contact bioautography* untuk mendeteksi penisilin yang berbeda. Setelah itu, Fischer dan Lautner memperkenalkan metode TLC untuk tujuan yang sama. Teknik ini menggabungkan TLC dengan metode deteksi biologis dan kimiawi sekaligus (Balouiri *et al.*, 2015).

2.5.3.1 Metode Difusi Agar

Metode ini juga dikenal dengan nama metode kontak agar. Metode ini menggunakan difusi agen antimikroba dari kromatogram (PC atau TLC) ke agar yang sebelumnya sudah diinokulasikan dengan mikroorganisme uji. Setelah dibiarkan beberapa menit atau beberapa jam untuk berdifusi, kromatogram diambil dan agar diinkubasi. Zona hambat akan terlihat pada tempat di mana komponen antimikroba berkontak dengan agar (Balouiri *et al.*, 2015).

2.5.3.2 Metode *Direct Bioautography*

Teknik ini paling sering digunakan dari metode TLC-*bioautography* yang ada. *Plate* TLC dicelupkan atau dismprot dengan suspensi mikroba. Kemudian, bioautogram diinkubasi selama 48 jam pada suhu 25°C dengan kondisi lembab. Untuk melihat pertumbuhan mikroba, biasanya digunakan garam tetrazolium. Garam ini akan mengalami konversi menjadi formazan dengan intensitas warna yang tinggi karena terjadinya dehidrogenase dari sel hidup. Reagen yang paling sesuai untuk deteksi adalah p-Iodoni-trotetrazolium violet. Garam tersebut disemprotkan ke bioautogram lalu diinkubasikan lagi selama 24 jam pada suhu

25°C atau selama 3 sampai 4 jam pada suhu 37°C. Agar Mueller Hinton sesuai untuk memberikan perlekatan yang paling baik untuk TLC dan mempertahankan kelembaban untuk pertumbuhan mikroba (Balouiri *et al.*, 2015).

2.5.3.3 Metode Agar Overlay Bioassay

Dikenal juga sebagai bioautografi imersi, teknik ini merupakan gabungan dari kedua metode yang telah disebutkan sebelumnya. *Plate* TLC ditutupi dengan medium agar cair yang telah diinokulasikan. Agar komponen yang diuji dapat berdifusi dengan baik ke media agar, *plate* dapat diletakkan pada suhu rendah selama beberapa jam sebelum dilakukan inkubasi. Setelah inkubasi dengan kondisi yang sesuai dengan mikroorganisme uji, pengecatan dapat dilakukan dengan cat tetrazolium (Balouiri *et al.*, 2015).

