

UJI POTENSI EKSTRAK ETANOL BAWANG PUTIH (*Allium sativum*)

SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM

***Streptococcus mutans* SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

Kusuma Ghaisani Shabrina

155070100111043

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**UJI POTENSI EKSTRAK ETANOL BAWANG PUTIH (*Allium sativum*)
SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Streptococcus mutans*
SECARA *IN VITRO***

Oleh:

Kusuma Ghaisani Shabrina
NIM: 155070100111043

Telah diuji pada
Hari : Jumat
Tanggal : 29 November 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I



Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes.
NIP. 195909261984032003

Penguji II/Pembimbing I



Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK
NIP. 194812201980021001

Penguji III/Pembimbing II



dr. Novi Khila Firani, M. Kes., Sp. PK
NIP. 197611022003122001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kedokteran,



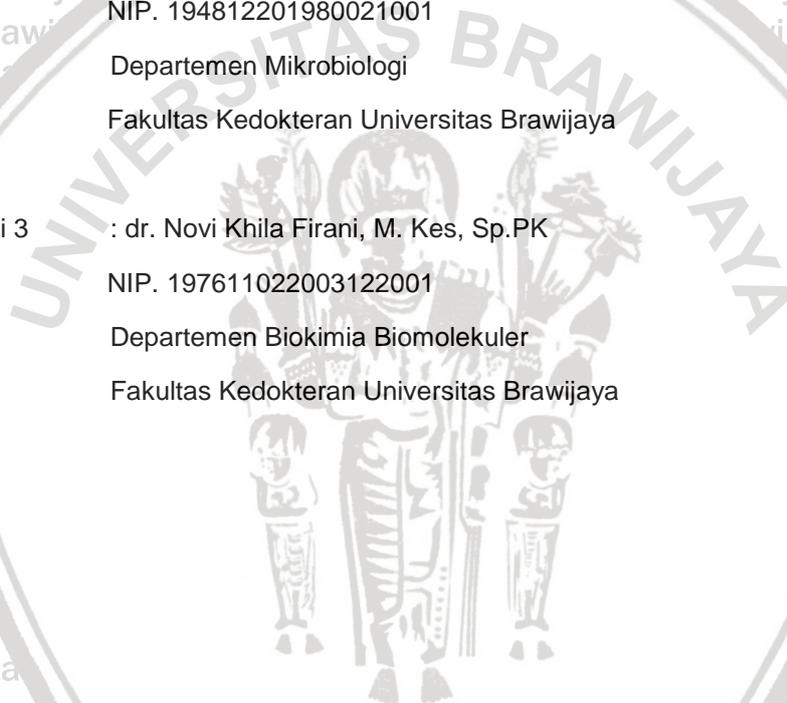
dr. Triwahju Astuti, M. Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

IDENTITAS TIM PENGUJI

Penguji 1 : Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes
NIP. 195909261984032003
Departemen Neurologi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Penguji 2 : Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK
NIP. 194812201980021001
Departemen Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Penguji 3 : dr. Novi Khila Firani, M. Kes, Sp.PK
NIP. 197611022003122001
Departemen Biokimia Biomolekuler
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Kusuma Ghaisani Shabrina

NIM : 155070100111043

Program Studi: Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya,

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 22 November 2018

Yang membuat pernyataan,



Kusuma Ghaisani Shabrina

NIM. 155070100111043

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

IDENTITAS

Nama : KUSUMA GHASANI SHABRINA
Tempat dan tanggal lahir : BALIKPAPAN, 13 APRIL 1996
Agama : ISLAM
Alamat Rumah : JL. SULFAT AGUNG 2 NO.11-A MALANG
Asal Instansi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Alamat Instansi : JL. VETERAN MALANG
Pendidikan Terakhir : SMA
Status Pernikahan : BELUM KAWIN
Alamat email : kusumaghaisanishabrina@gmail.com
Telepon : -

RIWAYAT PENDIDIKAN

No.	Jenjang Pendidikan	Sekolah	Tahun Lulus
1.	TK	BA. Restu I Malang	2002
2.	SD	MIN Malang I	2008
3.	SMP	SMPN 8 Malang	2011
4.	SMA	SMAN 3 Malang	2014
5.	S1	FKUB	

RIWAYAT PEKERJAAN

No.	Jabatan	Instansi	Tahun

PENGALAMAN PELATIHAN PROFESIONAL

No.	Tahun	Pelatihan	Penyelenggara

ABSTRAK

Shabrina, Kusuma Ghaisani. 2018. ***Uji Potensi Ekstrak Etanol Bawang Putih (Allium sativum) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Streptococcus mutans Secara In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK (2) dr. Novi Khila Firani, Sp. PK

Streptococcus mutans adalah bakteri yang dapat dijumpai di rongga mulut dan merupakan bakteri utama penyebab timbulnya karies gigi. Bakteri ini telah berevolusi untuk bergantung pada biofilm, struktur tiga dimensi dimana sel dapat bertahan hidup dan tahan terhadap antibiotik. Bawang putih (*Allium sativum* L.) menghasilkan senyawa-senyawa yang memiliki efek antibakteri berspektrum luas sehingga banyak dikembangkan menjadi antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan potensi ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Desain penelitian ini adalah *true experimental-post test only group design* dengan mengamati pembentukan cincin biofilm menggunakan uji tabung. Hasil Uji tabung difoto untuk pengukuran *Mean Gray Value* menggunakan *Adobe Photoshop CS6*. *Mean Gray Value* merupakan gambaran tingkat intensitas warna pada cincin biofilm pada *air fluid border* tabung. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan *Mean Gray Value* searah dengan peningkatan konsentrasi ekstrak dan penipisan cincin biofilm pada tabung. Terdapat korelasi yang signifikan antara nilai *Mean Gray Value* dan konsentrasi ekstrak ($p < 0,05$). Ada pengaruh peningkatan konsentrasi dalam menghambat pembentukan biofilm sebesar 85%. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol bawang putih mempunyai potensi sebagai penghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* secara *in vitro*.

Kata kunci : *Streptococcus mutans*, bawang putih, biofilm, *Mean Gray Value*

ABSTRACT

Shabrina, Kusuma Ghaisani. 2018. ***Potential Test of Garlic Ethanol Extract (Allium sativum) as an Inhibitor of Biofilm Formation in Streptococcus mutans In Vitro.***

Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine. Supervisor: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK (2) dr. Novi Khila Firani, Sp. PK

Streptococcus mutans is a bacterium that can be found in the oral cavity and is the main bacterium that causes dental caries. These bacteria have evolved to depend on biofilms, three-dimensional structures where cells can survive and are resistant to antibiotics. Garlic (*Allium sativum*) produces compounds that have broad spectrum antibacterial effects that are widely developed into antimicrobials. This study has a purpose, which is to prove the potential of garlic extract (*Allium sativum*) as an inhibitor of biofilm formation in *Streptococcus mutans in vitro*. The design of this study is true experimental-post test only group design by observing biofilm formation using a tube test. Tube test results photographed for Mean Gray Value measurements using Adobe Photoshop CS6. The Mean Gray Value is the color intensity of the biofilm ring on the tube's air fluid border. There is an increase in the Mean Gray Value correlated with the increase in extract concentration and thinning of the biofilm ring on the tube. The analysis results obtained a significant correlation between the value of Mean Gray Value and concentration of extract ($p < 0.05$). The results were accompanied by the effect of increasing concentration in inhibiting biofilm formation 85%. The conclusion of this study is that garlic ethanol extract has the potency to inhibit the formation of *Streptococcus mutans* biofilm in vitro.

Keyword : *Streptococcus mutans*, garlic, biofilm, Mean Gray Value

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT. karena atas rahmat dan izin-Nya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul "Uji Potensi Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Streptococcus mutans* Secara *In Vitro*. Tugas akhir ini dibuat untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Kedokteran umum.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK, sebagai pembimbing pertama yang selalu membimbing dan dengan sabar memberi arahan sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini dengan lancar.
2. dr. Novi Khila Firani, M. Kes., Sp. PK sebagai pembimbing kedua yang telah membimbing penulis dengan sabar memberi banyak bantuan dalam pengerjaan Tugas Akhir penulis.
3. Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes., sebagai Ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberikan masukan untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir.
4. dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K), sebagai Ketua Program Studi Kedokteran yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di Program Studi Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
5. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi, sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.
7. Kedua orang tua penulis Wahyudi Joko Susilo dan Rias Gesang Kinanti serta seluruh anggota keluarga, atas segala doa, bantuan, pengertian, dan kasih sayangnya.
8. Maria Rinonce, teman yang selalu membantu, menemani dalam suka dan duka, serta menjadi sumber semangat bagi penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir.
9. Ajeng Maharani Putri, Nabilah Hanifah Mukti, Muhammad Rizal Shidiq, Bimo Donoseputro, Ibnu Diptya, Ditra Tryasniansa, dan Andi Permana, atas segala

dukungan dan dorongan motivasi yang tiada henti serta semangat tinggi dalam belajar.

10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna.

Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun sehingga dapat meningkatkan kemampuan penulis di masa yang akan datang. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi semua yang membutuhkan.

Malang, 22 November 2018

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
<i>Abstract</i>	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xii
Daftar Gambar	xiii
Daftar Lampiran	xiv
Daftar Singkatan	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	6
2.1.1 Taksonomi	6
2.1.2 Morfologi	7
2.1.3 Patogenesis	8

2.2 Biofilm.....	9
2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm.....	9
2.2.2 Struktur Biofilm.....	11
2.2.3 Fungsi Biofilm dan Perannya Terhadap Resistensi Bakteri.....	12
2.2.4 Uji Pembentukan Biofilm.....	12
2.2.4.1 <i>Microtiter Dish Assay</i>	12
2.2.4.2 Metode Tabung.....	13
2.2.4.3 Metode <i>Congo Red Agar</i>	14
2.3 Bawang putih (<i>Allium sativum</i>).....	15
2.3.1 Taksonomi.....	15
2.3.2 Morfologi.....	16
2.3.3 Kandungan Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>).....	17
2.4 Metode Ekstraksi.....	19
2.4.1 Prinsip Proses Ekstraksi.....	19
2.4.2 Metode Ekstraksi Maserasi.....	20
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....	22
3.1 Kerangka Konsep Peneliitian.....	22
3.2 Hipotesis Penelitan.....	24
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	25
4.1 Rancangan Penelitian.....	25
4.2 Populasi dan Sampel.....	25
4.3 Variabel Penelitian.....	26
4.3.1 Variabel Bebas.....	26
4.3.2 Variabel Tergantung.....	26
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	27
4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	27
4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Bawang Putih.....	27
4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri.....	27

4.5.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm	28
4.6 Definisi Operasional	28
4.7 Prosedur Penelitian	30
4.7.1 Persiapan Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>)	30
4.7.2 Identifikasi Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	30
4.7.2.1 Pewarnaan Gram	30
4.7.2.2 Uji Biokimia	31
4.7.2.3 Tes Vitek 2 <i>Compact</i>	32
4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair <i>Streptococcus mutans</i>	32
4.7.4 Uji Pembentukan Biofilm (Metode <i>tub-test</i>)	33
4.7.5 Uji Hambat Pembentukan Biofilm (Metode <i>tub-test</i>)	34
4.7.5.1 Uji Pendahuluan	34
4.7.5.2 Penelitian Inti	35
4.7.6 Pengukuran <i>Mean Gray Value</i>	36
4.8 Analisis Data	37
4.9 Rancangan Operasional Penelitian	39
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	40
5.1 Hasil Penelitian	40
5.1.1 Hasil Ekstraksi Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>)	40
5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri	41
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm	42
5.2 Analisis Data	46
5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas	47
5.2.2 Hasil Uji <i>One-Way ANOVA</i>	48
5.2.3 Hasil Uji <i>Post Hoc Multiple Comparison</i>	48
5.2.4 Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i>	50
5.2.5 Hasil Uji Regresi	51
BAB 6 PEMBAHASAN	53

BAB 7 PENUTUP

59

7.1 Kesimpulan

59

7.2 Saran

59

DAFTAR PUSTAKA

61

LAMPIRAN

66



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Hasil Perhitungan Konsentrasi Volume Ekstrak dan Suspensi Bakteri Penelitian inti.....

Tabel 4.2 Hasil Perhitungan Konsentrasi Volume Ekstrak dan Suspensi Bakteri Penelitian inti.....

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran *Mean Gray Value* dengan Aplikasi *Adobe Photoshop CS6*.....

Tabel 5.1 Hasil Uji Normalitas dengan Metode *Shapiro-Wilk*.....

Tabel 5.2 Hasil Uji Homogenitas dengan Metode *Levene*.....

Tabel 5.4 Hasil Uji *Oneway ANOVA*.....

Tabel 5.5 Hasil Uji *Post Hoc Multiple Comparison*.....

Tabel 5.6 Rangkuman Hasil Uji *Post Hoc Multiple Comparison*.....

Tabel 5.7 Hasil Uji Korelasi *Pearson*.....

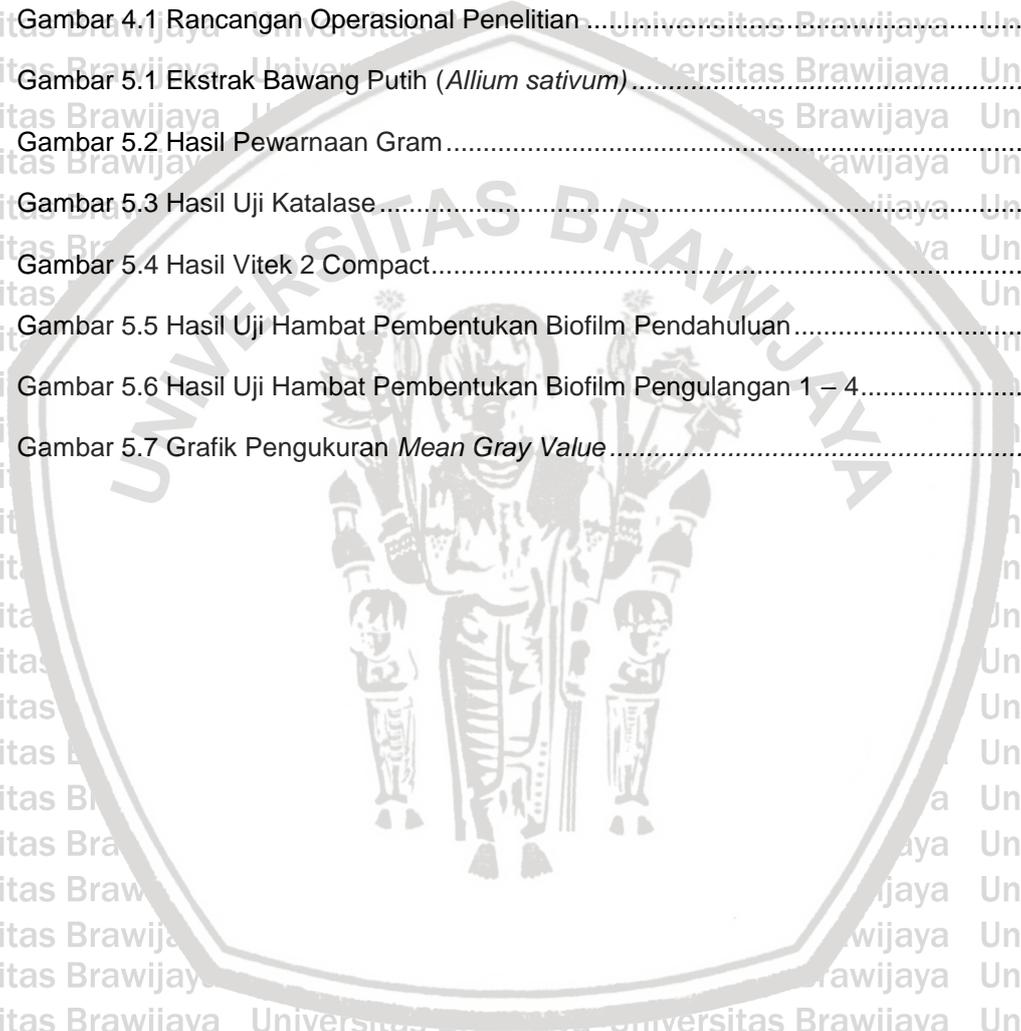
Tabel 5.8 Hasil Uji Regresi.....

Tabel 5.9 Hasil *R Square*.....

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 *Streptococcus mutans*
Gambar 2.2 Bawang Putih (*Allium sativum*)
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....
Gambar 4.1 Rancangan Operasional Penelitian
Gambar 5.1 Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*)
Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram
Gambar 5.3 Hasil Uji Katalase.....
Gambar 5.4 Hasil Vitek 2 Compact.....
Gambar 5.5 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pendahuluan.....
Gambar 5.6 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan 1 – 4.....
Gambar 5.7 Grafik Pengukuran *Mean Gray Value*.....



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lebih dari 50 persen masyarakat di Indonesia mengalami karies gigi, hal tersebut menempatkan penyakit gigi dan mulut menjadi salah satu permasalahan kesehatan yang cukup besar di Indonesia. Prevalensi nasional masalah gigi dan mulut mencapai 25,9 persen (Riskesdas, 2013). *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), salah satu bakteri penting yang dijumpai dirongga mulut merupakan bakteri penyebab utama timbulnya karies gigi (Tarigan, 1990). Bakteri ini bergantung pada biofilm untuk bertahan hidup dan bertahan dalam ekosistem alaminya, yaitu plak gigi (Li *et al.*, 2002). Melalui mekanisme perlekatan atau adhesi pada permukaan padat, *S. mutans* mampu membentuk koloni di dalam rongga mulut dan membentuk sebuah biofilm bakteri. Fitur ini memungkinkan mikroorganisme membentuk struktur tiga dimensi dimana sel menjadi lebih tahan terhadap antibiotik dan mengubah kondisi lingkungan, antara lain melalui perubahan yang terjadi akibat interaksi antibakteri dan adanya matriks eksopolisakarida yang melindungi keseluruhan struktur (Krzyściak *et al.*, 2014).

Dalam membentuk biofilm atau dental *plaque*, *S. mutans* akan membentuk mikrokoloni yang semakin menebal dan menghasilkan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan. Dalam perkembangannya *S. mutans* akan mengeluarkan sinyal kimia, yaitu *Quorum Sensing* yang berperan dalam pematangan biofilm. Sinyal ini penting untuk

kompetensi genetic *S. mutans* dan juga dalam proses pembentukan biofilm pada organisme gram positif ini. (Sanadheera dan Cvitkokvitch, 2008)

Setelah ditemukannya *S. mutans* sebagai agen etiologi dari karies gigi, banyak perhatian difokuskan pada bakteri ini, yaitu sebagai target dilakukannya pencegahan dengan menggunakan agen antimikroba. Penggunaan antibiotik untuk pencegahan dan pengobatan karies gigi akan berbahaya untuk pasien dan juga dapat menimbulkan *Multi Drug Resistance* (MDR) pada bakteri ini (Fani dkk., 2007). Produk alam telah menjadi alternatif yang baik untuk agen antimikroba kimia sintetis dan antibiotik, karena meningkatnya efek samping yang serius, resistensi antimikroba, dan munculnya infeksi yang jarang terjadi sebelumnya karena penggunaan antimikroba berlebihan dengan cara yang tidak tepat. Ada beberapa laporan dalam literatur ilmiah yang menggambarkan sifat antimikroba dari ekstrak kasar yang dibuat dari tanaman (Mohsenipour dan Hassanshahian, 2015).

Bawang putih (*Allium sativum L.*) merupakan salah satu produk alam yang banyak dikembangkan menjadi sebuah antimikroba. Bawang putih menghasilkan senyawa – senyawa *thiosulfinat* yang memiliki efek antibakteri berspektrum luas (Kemper dan Kathi, 2000). Berdasarkan penelitian Zhai *et al.* dalam Wangi (2017), bawang putih dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus epidermidis* melalui pencegahan proses adhesi dan *detachment* dan bertindak sebagai agen antibiofilm. *Allium sativum* mengandung *N- (Heptylsulfanylacetyl)-L- Homoserine-Lactone*, *Alliin*, dan derivat organosulfur lainnya, seperti *allicin*, *ajoene*, dan *allyl methyl sulfide*, yang mampu menghambat sistem *Quorum Sensing* (Persson *et al.*, 2005).

Kemampuan *Allium sativum* sebagai antimikroba erat kaitannya dengan kandungan senyawa *allicin* yang berperan terhadap mekanisme pertahanan bawang putih terhadap serangga dan mikroorganisme (Ankri S, Mirelman D, 1999). *Allicin* dapat menghambat secara total sintesis RNA bakteri dan menghambat sintesis DNA dan protein bakteri secara parsial (Salima, 2015). Penelitian Wu *et al.* (2015) menemukan bahwa *allicin* pada bawang putih memiliki efek bakterisida pada biofilm *S. epidermidis* dan menemukan bahwa Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) pada ekstrak bawang putih 1,56 µg/ml untuk ekstrak dengan pelarut air dan 0,78 µg/ml untuk ekstrak etanol yang secara signifikan lebih rendah daripada KHBM ekstrak *allicin* murni, yaitu 12,5 µg/ml.

Etanol merupakan pelarut yang lebih baik daripada air, metanol, dan pelarut lain dalam mengekstraksi senyawa antioksidan maupun antibakteri (Hirasawa, 1999).

Berdasarkan uraian di atas maka peneliti ingin meneliti potensi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *S. mutans* in vitro.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini ditujukan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut :

Apakah ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada *S. mutans* secara in vitro?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan potensi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *S. mutans* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) dari ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S. mutans* secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap Mean Gray Value (MGV) biofilm *S. mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi ilmiah terkait manfaat ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S. mutans*.
2. Memberikan wawasan bagi masyarakat umum mengenai manfaat dari bawang putih (*Allium sativum*), yaitu sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S. mutans*.

1.4.2 Manfaat Praktis

Diharapkan penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya mengenai manfaat ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *S. mutans*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Streptococcus mutans*

Streptococcus adalah bakteri berbentuk bulat gram (+) positif yang secara khas berbentuk pasangan atau membentuk rantai selama pertumbuhan. Mereka tersebar luas di alam. Beberapa merupakan anggota mikrobiota normal pada manusia dan lainnya dikaitkan dengan penyakit penting pada manusia yang disebabkan oleh efek langsung dari infeksi atau pada kasus lain terhadap respons kekebalan tubuh (Jawetz *et al.*, 2017).

Streptococcus mutans (*S. mutans*) pertama kali diisolasi oleh Clark pada tahun 1974 dari gigi manusia yang mengalami karies. Bakteri ini berperan penting terhadap terjadinya karies gigi. Istilah *S. mutans* diambil berdasarkan hasil pemeriksaan mikrobiologi dengan pengecatan gram. Bakteri berbentuk oval dan lain dari bentuk spesies *Streptococcus* lain sehingga disebut sebagai mutan dari *Streptococcus* (Fatmawati, 2011)

2.1.1 Taksonomi

Menurut Michalek dan Noel dalam Fatmawati (2011), taksonomi dari *S. mutans* adalah sebagai berikut:

Kingdom : Monera

Divisio : Firmicutes

Class : Bacili

Order : Lactobacillales

Family : Streptococcaceae

Genus : Streptococcus

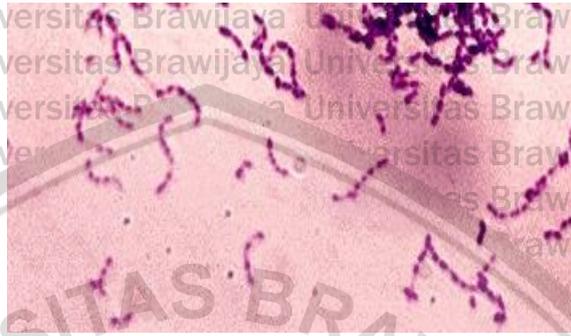
Species : *Streptococcus mutans*

2.1.2 Morfologi

Streptococcus mutans merupakan bakteri gram positif yang bersifat nonmotil (tidak bergerak) dan merupakan bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk kokus yang berbentuk bulat atau bulat telur dan membentuk rantai. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18^o-40^oC. *S. mutans* sering kali ditemukan pada rongga gigi manusia yang luka dan menjadi bakteri utama penyebab karies untuk email gigi. Bakteri gram positif ini bersifat asidogenik, yaitu menghasilkan asam, asidodurik, mampu tinggal pada lingkungan asam, dan menghasilkan suatu polisakarida yang lengket disebut dextran. Kemampuan ini membuat *S. mutans* mampu menyebabkan lengket yang akan mendukung bakteri asidourik lain menuju ke email gigi, dan asam akan melarutkan email gigi (Nugraha, 2008).

Pada penelitian Rahardjo dan Indah dalam Hidayati (2010) disebutkan bahwa *S. mutans* yang ditanam pada *blood agar* mempunyai karakteristik sebagai berikut, yaitu ukuran koloni 0,5-1 mm, berwarna abu-abu translucent hingga putih, permukaan koloni kasar dengan konfigurasi radial, melekat erat pada agar, biasanya membentuk α hemolisa atau non hemolisa akan tetapi ada strain yang membentuk β hemolisa. Pada medium yang mengandung sukrosa menghasilkan

polisakarida ekstra seluler, mempunyai karakteristik opaque, kasar, koloni berwarna putih, tidak melekat erat pada medium, di sekitar koloni dibasahi produk polimer glukran.



Gambar 2.1 *Streptococcus mutans* (Facklam, 1975)

Keterangan: *S. mutans* dengan pengecatan gram, terlihat bakteri gram positif (berwarna ungu) membentuk rantai.

2.1.3 Patogenesis

S. mutans merupakan bakteri penting yang dijumpai dirongga mulut serta dianggap sebagai bakteri utama penyebab timbulnya karies gigi (Tarigan, 1990).

S. mutans memiliki enzim yang bersifat destruktif, salah satunya enzim hialuronidase. Enzim ini merusak jembatan antar sel yang terbuat dari jaringan ikat hialin yang memiliki fungsi penting sebagai transpor nutrisi antar sel, sebagai jalur komunikasi antar sel, sebagai unsur penyusun, dan penguat jaringan. Jika sebagian besar mengalami kerusakan, dapat diperkirakan kelangsungan hidup jaringan dapat terancam nekrosis (Rasuna, 2007).

Karakteristik dari bakteri ini, yaitu mampu mensintesis polisakarida ekstraseluler glukran ikatan α (1–3) yang tidak larut dari sukrosa, dapat memproduksi asam laktat melalui proses homofermentasi, membentuk koloni yang melekat dengan erat pada permukaan gigi, dan lebih bersifat asidogenik

dibanding spesies *Streptococcus* lainnya (Sabir, 2005). Oleh sebab itu, *S. mutans* telah menjadi target utama dalam upaya mencegah terjadinya karies gigi.

2.2 Biofilm

Biofilm merupakan kumpulan dari sel – sel mikroba yang melekat secara ireversibel pada suatu permukaan dan terbungkus dalam matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang dihasilkan sendiri (Gunardi, 2014). Biofilm pada permukaan gigi sering disebut sebagai dental plak. Dental plak merupakan sekumpulan beranekaragam mikroorganisme pada permukaan gigi, yang melekat kuat pada matriks ekstraseluler host dan polimer mikroba. *Streptococcus* sp. merupakan strain bakteri yang mengawali pembentukan plak dan *S. mutans* merupakan penyebab utama adanya plak dan karies gigi (Tahmourepour *et al.*, 2010).

Biofilm tumbuh melalui tiga tahap proses yaitu tahap awal yang terdiri dari perlekatan bakteri pada substrat, bakteri tumbuh dan membelah kemudian membentuk kolonisasi di lingkungan sekitar dan akhirnya terbentuklah biofilm.

Bakteri ini tidak bekerja secara individual untuk membentuk biofilm, tetapi berkumpul menjadi rantai yang panjang untuk membantu mengawali tahap awal pembentukan biofilm (Armitage, 2005).

2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Biofilm terbentuk dari terjadinya adhesi, yaitu melekatnya beberapa bakteri yang hidup bebas di suatu permukaan dan kemudian memperbanyak diri dengan

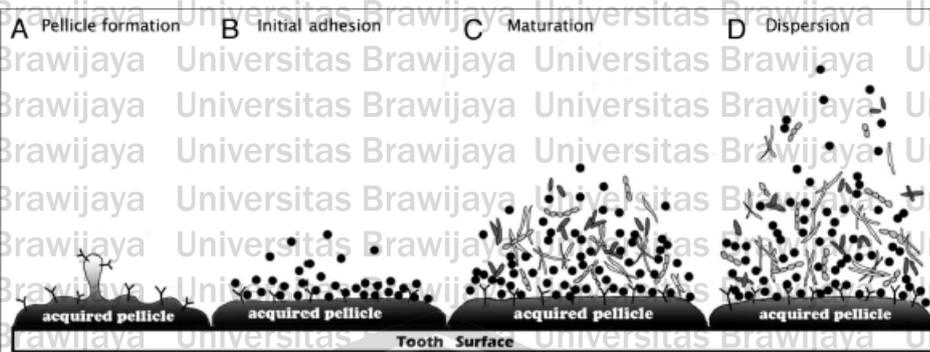
membentuk suatu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm (Gunardi, 2014). Pada pembentukan plak gigi, akan terjadi interaksi antara *acquired pellicle* dan bakteri.

Acquired pellicle melekat pada enamel gigi setelah gigi erupsi atau pada permukaan gigi yang baru saja dibersihkan sehingga gigi berkontak langsung dengan saliva (Listyasari, 2012).

Kemudian bakteri akan membentuk suatu mikrokoloni yang akan terus tumbuh, semakin menebal, dan menghasilkan EPS yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan. Dalam perkembangannya, sel-sel bakteri mengeluarkan sinyal kimia, yaitu *quorum sensing* yang berperan dalam membentuk karakteristik biofilm yang lebih matang. Sinyal ini diinduksi oleh pembawa pesan kimia (*chemical messenger*) yang dilepaskan bakteri ke lingkungannya dalam konsentrasi yang proporsional dengan pertumbuhan populasi bakteri tersebut.

Quorum sensing pada *S. mutans* diketahui meregulasi beberapa fenotip, yaitu pembentukan biofilm, induksi kompetensi, *Acid Tolerance Response (ATR)*, dan produksi bakteriosin. Sistem sinyal *Quorum Sensing* penting untuk kompetensi genetik pada *S. mutans* dan juga dalam proses pembentukan biofilm pada organisme gram positif ini (Senadheera dan Cvitkovitch, 2008).

Biofilm yang matang telah terbentuk dan sekarang terdiri dari banyak spesies bakteri. Ketika bakteri hidup saling berdampingan, terkadang satu spesies membutuhkan metabolit spesies lainnya dan mereka saling membutuhkan. Biofilm ini merupakan suatu struktur yang dinamik dengan sel-sel yang terus silih berganti masuk dan meninggalkan komunitasnya. Dalam proses ini sel-sel *signaling* mengambil peranan yang penting (Gunardi, 2014).



Gambar 2.2 Mekanisme Pembentukan Biofilm (Huang, 2011)

2.2.2 Struktur Biofilm

Biofilm adalah kumpulan mikroba yang terikat pada suatu permukaan dan dilindungi oleh matriks polimer yang dihasilkan sendiri. *S. mutans* dapat memodulasi berbagai sifat fisiologis dan fisik yang akan bermanfaat bagi pertumbuhan, keselamatan, dan keberadaannya di rongga mulut. Contohnya, matrix biofilm yang dapat menjadi sebuah hambatan difusi dan membatasi penetrasi dari antimikroba menuju sel terdalam (Senadheera dan Cvitkovitch, 2008).

Unit struktural dari biofilm adalah mikrokoloni dan proses dasar pembentukan dari biofilm seperti mekanisme *Quorum Sensing*, resistensi antimikroba, dan perlekatan yang dapat menerangkan interaksi fisiologis dari mikrokoloni dalam biofilm yang telah matang. Biofilm terutama terdiri dari materi matriks (85% dari volume) dan kumpulan sel-sel bakteri (15% dari volume).

EPS mungkin menyusun 50%-90% karbon organik biofilm dan dapat dianggap sebagai material matriks yang utama. EPS bervariasi secara fisik dan kimia, tapi terutama terdiri dari polisakarida. EPS bersifat hidrofilik karena dapat mengikat air dalam jumlah yang banyak, dengan tingkat kelarutan yang berbeda-beda (Donlan dan Cossteron, 2002).

2.2.3 Fungsi Biofilm dan Peranannya terhadap Resistensi Bakteri

Peran biofilm terhadap mikroba adalah sebagai perlindungan, pertahanan, nutrisi, dan variasi genetik. Perlindungan, bakteri mengeluarkan zat ekstra-polimer yang sangat penting yang dikenal sebagai eksopolisakarida. Matriks ini melindungi bakteri dari lingkungan eksternal seperti radiasi UV, pergeseran pH, suhu, gerakan osmotik, dan pengeringan tanpa mempengaruhi pasokan nutrisinya (Nichols *et al.*, 1988).

Biofilm berfungsi sebagai mekanisme pertahanan bagi bakteri dengan cara meningkatkan resistensi terhadap gaya fisik yang dapat menurunkan perkembangan sel-sel bakteri yang tidak menempel, fagositosis oleh sel imun, dan penetrasi dari senyawa toksik bagi bakteri seperti antibiotik. Bakteri yang mempunyai biofilm lebih resisten 10-1.000 kali dibandingkan bila tidak mempunyai biofilm (Monroe, 2007).

Menurut Decho dan Flemming dalam Yuliandari (2015), di dalam biofilm, bakteri memiliki akses terbatas terhadap nutrisi dan memiliki pasokan oksigen yang rendah. Mereka berkomunikasi satu sama lain dengan saluran selular dan sinyal lingkungan. Berkoloninya bakteri di dalam biofilm akan lebih memudahkan terjadinya transfer gen di antara populasi sehingga muncul bakteri resisten yang menjadi perhatian besar juga karena penggunaan antibiotik rekayasa genetika mikroorganisme dan sebagainya (Scink B, 1997).

2.2.4 Uji Pembentukan Biofilm

2.2.4.1 *Microtiter Dish Assay*

Microtiter Dish Assay merupakan alat yang penting dalam penelitian mengenai pertumbuhan biofilm dan secara utama digunakan untuk meneliti biofilm

bakteri maupun jamur. Metode ini menunjukkan pembentukan biofilm di dinding dan dasar dari *microtiter dish*. Metode ini telah dipakai untuk penelitian terhadap banyak jenis mikroba, yaitu *Pseudomonas*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *mycobacteria*, dan jamur, namun tidak terbatas mikroba itu saja. Prosedur yang dilakukan, yaitu melakukan kultur bakteri pada *microtiter dish*, menginkubasi selama 24 jam pada 37°C kemudian sel bakteri dibuang dan dilakukan pengecatan *microtiter dish* dengan Kristal violet (O'toole, 2011).

Kemudian dilakukan analisa *Optical Density* (OD) dengan menggunakan *micro ELISA auto reader* pada panjang gelombang 570 nm. Hasil OD menunjukkan index bakteri yang menempel di permukaan dan membentuk biofilm (Marthur, 2005).

2.2.4.2 Metode Tabung

Metode tabung merupakan pengamatan secara kualitatif terhadap pertumbuhan biofilm bakteri. Dilakukan inokulasi bakteri dalam TSB + *glucose* yang akan inkubasi dalam tabung selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah itu larutan dibuang dan tabung di cat dengan Kristal violet dan dinilai 0 (tidak membentuk biofilm), 1 (lemah), 2 (sedang), dan 3 (kuat) Metode ini memiliki korelasi yang baik dengan metode *Tissue Culture Plate* untuk bakteri pembentuk biofilm kuat (skor 3). Namun, cukup sulit untuk menentukan apakah suatu bakteri merupakan bakteri pembentuk biofilm sedang dan lemah (Mathur, 2005).

Secara kuantitatif, biofilm yang terbentuk di dinding tabung dapat diukur berdasarkan intensitas warna. Andiyani dan Hidayati (2013) melakukan uji hambat

pembentukan biofilm dengan menggunakan *Adobe Photoshop* untuk mengukur *Mean Gray Value* (MGV). Pengukuran intensitas warna biofilm menggunakan MGV ini telah diulas dalam beberapa jurnal salah satunya yaitu "*Heterotrophic Pioneers Facilitate Phototrophic Biofilm Development*" *Department of Biotechnology, Delft University of Technology, The Netherlands* yang mengulas bahwa intensitas warna biofilm yang terbentuk dapat dihitung secara kuantitatif melalui hasil foto biofilm dengan kamera digital dan ditentukan mean dan standar deviasi pada *gray value* melalui measurement tool (G. Roeselers et al., 2007).

Aplikasi *Adobe Photoshop CS6* mampu mengukur mean gray value melalui measurement tool dan MGV dinyatakan dalam skala 0 – 255, dimana 0 menunjukkan hitam dan 225 menunjukkan putih. Selain itu, *Wolfaardt, et al.* (1994) juga menganalisis degradasi biofilm dan mengukur MGV 20 gambar biofilm menggunakan *Bio-Rad software* dengan skala yang sama.

2.2.4.3 Metode Congo Red Agar

Freeman et al. telah menjelaskan metode alternative dalam *screening* pembentukan biofilm pada isolate *Staphylococcus*. Metode ini membutuhkan persiapan khusus, yaitu medium padat *Brain Heart Infusion* (BHI) disuplementasi dengan sukrosa 5% dan *Congo Red*. *Plate* kemudian di inokulasi dan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil positif diindikasikan dengan adanya koloni hitam dengan konsistensi *crystalline* kering. Eksperimen dilakukan di tiga *plate* dan di ulang tiga kali. Metode ini menunjukkan korelasi yang sangat kecil dibanding dengan metode lain, sensitivitas terhadap pertumbuhan biofilm rendah, yaitu 7,6% (*Mathur, 2005*).

2.3 Bawang Putih (*Allium sativum*)

2.3.1 Taksonomi

Tanaman bawang putih merupakan salah satu herba semusim famili Liliaceae. Salah satu manfaat medis bawang putih yang telah lama dipelajari oleh para klinisi ialah kemampuan atau potensi bawang putih sebagai antibiotik.

Sudah banyak penelitian menyatakan bahwa ekstrak bawang putih dengan efektif menunjukkan aktivitas yang baik terhadap banyak jenis bakteri, baik itu bakteri gram negatif ataupun gram positif. Hal ini menjadikan ekstrak bawang putih memiliki sifat antibakteri berspektrum luas (Salima, 2015).

Menurut Syamsuhidayat dan Hutapea (1991) dalam solikhah (2009), taksonomi bawang putih (*Allium sativum*) sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Devisi	: Spermatophyta
Kelas	: Monocotyledone
Ordo	: Liliales
Famili	: Liliaceae
Genus	: <i>Allium</i>
Spesies	: <i>Allium sativum</i>

2.3.2 Morfologi

Bawang putih merupakan tanaman herba parenial yang membentuk umbi lapis. Tanaman ini tumbuh secara berumpun dan berdiri tegak sampai setinggi 30-75 cm. Batang yang nampak di atas permukaan tanah adalah batang semu yang terdiri dari pelepah-pelepah daun. Sedangkan batang yang sebenarnya berada di dalam tanah. Dari pangkal batang tumbuh akar berbentuk serabut kecil yang banyak dengan panjang kurang dari 10 cm. Akar yang tumbuh pada batang pokok bersifat rudimenter, berfungsi sebagai alat penghisap makanan (Santoso, 2000).

Bawang putih membentuk umbi lapis berwarna putih. Sebuah umbi terdiri dari 8–20 siung (anak bawang). Antara siung satu dengan yang lainnya dipisahkan oleh kulit tipis dan liat, serta membentuk satu kesatuan yang kuat. Di dalam siung terdapat lembaga yang dapat tumbuh menerobos pucuk siung menjadi tunas baru, serta daging pembungkus lembaga yang berfungsi sebagai pelindung sekaligus gudang persediaan makanan (Santoso, 2000; Zhang, 1999).



Gambar 2.3 Bawang Putih (*Allium sativum*) (Litbang Departemen Pertanian, 2008)

2.3.3 Kandungan Bawang Putih (*Allium sativum*)

Kandungan kimia dari *Allium sativum* yang memiliki aktivitas biologi dan bermanfaat dalam pengobatan adalah senyawa organosulfur (Martinez, 2007).

Jika *Allium sativum* dihancurkan maka akan terjadi pelepasan enzim *allinase* yang dengan cepat melisiskan *allin* dengan memecah ikatan karbon dan sulfur *allin* untuk membentuk *sulfenic acid* (R-SOH) dan senyawa ini dengan segera akan berkondensasi menjadi *allicin* dan *thiosulfinat* lainnya (Singh dan Singh, 2008)

Allicin dapat menghambat secara total sintesis RNA bakteri dan menghambat sintesis DNA dan protein bakteri secara parsial. Walaupun dikatakan bahwa sintesis DNA dan protein juga mengalami penghambatan oleh aktivitas *allicin*, RNA tetap menjadi target utama aktivitas antibakteri yang dimiliki *allicin* (Salima, 2015). Diantara banyaknya kandungan sulfur yang terkandung dalam bawang putih, *allicin* merupakan komponen sulfur yang memiliki aktivitas antibakteri yang paling besar, selain itu pula, *allicin* juga merupakan komponen yang bertanggung jawab atas manfaat terapeutik bawang putih yang lainnya, seperti antijamur, dan antivirus. *Allicin* (*Diallyl Thiosulfinate*) memiliki sifat yang kurang stabil, oleh karena itu, dalam beberapa jam dalam suhu ruangan, akan kembali mengalami metabolisme menjadi vinylthioliines atau diallyldisulfide atau yang disebut ajoene.

Ajoene memiliki aktivitas antistaphylococcal (bakterisidal) dengan Kadar Hambat Minimum (KHM) sebesar 16 µg/ml dan juga bersifat antibakteri terhadap species *Bacillus*, *Mycobacterium*, dan *Streptomyces* (Gibbons, 2004). Senyawa sulfur ini memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme yang sama dengan *allicin*, namun dengan potensi yang lebih kecil. Ajoene dianggap sebagai *Quorum Sensing Inhibitor* (QSI) utama yang terkandung di dalam bawang putih.

Treatment menggunakan ajoene terhadap biofilm secara *in vitro* terbukti sinergis dengan efek antimikrobal dari tobramycin (Jakobsen *et al.*, 2012).

Bawang putih juga mengandung komponen minyak atsiri, yang juga memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme menghambat pembentukan membran sel bakteri (Salima, 2015). Senyawa fenol pada minyak atsiri daun kemangi memiliki aktivitas antibakteri sehingga mengakibatkan terganggunya komunikasi *Quorum Sensing* pada koloni bakteri untuk membentuk biofilm (Ardani dkk., 2010). Kemungkinan mekanismenya dimulai dari pertumbuhan bakteri yang dihambat oleh senyawa fenol yang mengakibatkan jumlah bakteri berkurang sehingga kemampuan koloni bakteri untuk saling berkomunikasi menjadi terhambat. Hal ini membuat terganggunya produksi lapisan EPS oleh bakteri yang berfungsi menjaga integritas biofilm sehingga berakibat terhambatnya pembentukan biofilm (Susanto dkk, 2012).

Allium sativum juga mengandung senyawa sulfur larut air yang non volatil seperti S- allil sistein (SAC), yang terbentuk dari reaksi enzimatik γ -glutamilsisteine ketika bawang putih diekstraksi dengan air (Amagase, 2001). SAC banyak terdapat dalam berbagai macam sediaan bawang putih, merupakan senyawa yang memiliki aktivitas biologis, sehingga adanya SAC dalam sediaan bawang putih sering dijadikan standar bahwa sediaan bawang putih tersebut layak dikonsumsi atau tidak (Amagase, 2006).

2.4 Metode Ekstraksi

2.4.1 Prinsip Proses Ekstraksi

Ekstraksi adalah teknik pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut diantara dua pelarut yang saling bercampur (Harborne, 1996).

Secara umum, ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat dan ekstraksi tunggal. Ekstraksi bertingkat dilakukan dengan cara merendam sampel dengan pelarut berbeda secara berurutan, dimulai dengan pelarut non polar lalu dengan pelarut yang kepolarannya menengah kemudian dengan pelarut polar, dengan demikian akan diperoleh ekstrak kasar yang mengandung berturut-turut senyawa non polar, semi polar, dan polar. Metode ini berguna ketika berkerja dengan skala gram. Sedangkan ekstraksi tunggal dilakukan dengan cara merendam sampel dengan satu jenis pelarut tertentu (Harborne, 1987).

Etanol merupakan pelarut golongan alkohol yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder, karena etanol mempunyai gugus alkil yang bersifat non polar. Etanol dipertimbangkan sebagai pelarut karena etanol lebih selektif, tidak mudah ditumbuhi kapang dan jamur tidak beracun, netral dan absorbansinya baik. Etanol dapat bercampur dengan segala perbandingan panas yang diperlukan untuk perekatan yang lebih sedikit (Hargono, 1986).

Etanol disebut juga etil alkohol yang lebih dikenal sebagai alkohol yang merupakan senyawa organik. Dalam kondisi kamar, etanol berwujud cairan yang mudah menguap, mudah terbakar dan tak berwarna. Etanol biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa aktif yang bersifat antioksidan, antibakteri

dan antijamur pada suatu bahan. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa pelarut etanol lebih baik dari pada air, metanol maupun pelarut lain dalam mengekstraksi senyawa antioksidan maupun antibakteri (Hirasawa, 1999).

2.4.2 Metode Ekstraksi Maserasi

Metode yang digunakan pada penelitian ini untuk mengekstrak bawang putih (*Allium sativum*) adalah metode maserasi. Metode maserasi ini menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 500 gram bawang putih terlebih dahulu dikupas kulitnya dan dicuci bersih, selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C. Kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk kering. Serbuk kering direndam dalam 2 liter pelarut etanol 96% selama 2x24 jam kemudian diambil filtratnya dengan penyaringan. Pengadukan pada metode maserasi dilakukan sebanyak 12 kali selama 15 menit. Kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan fitrat dari ampas. Hasil saringan kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sampai kental sehingga didapatkan ekstrak bawang putih dengan konsentersasi 100% (Karina, 2013).

Vacuum Rotary Evaporator adalah alat yang berfungsi untuk memisahkan suatu larutan dari pelarutnya sehingga dihasilkan ekstrak dengan kandungan kimia tertentu sesuai yang diinginkan. Cairan yang ingin diuapkan biasanya ditempatkan dalam suatu labu yang kemudian dipanaskan dengan bantuan penangas, dan diputar. Uap cairan yang dihasilkan didinginkan oleh suatu pendingin (kondensor) dan ditampung pada suatu tempat (*receiver flask*). Kelebihan dari alat ini adalah diperolehnya kembali pelarut yang diuapkan. Prinsip kerja alat ini didasarkan pada titik didih pelarut dan adanya tekanan yang menyebabkan uap dari

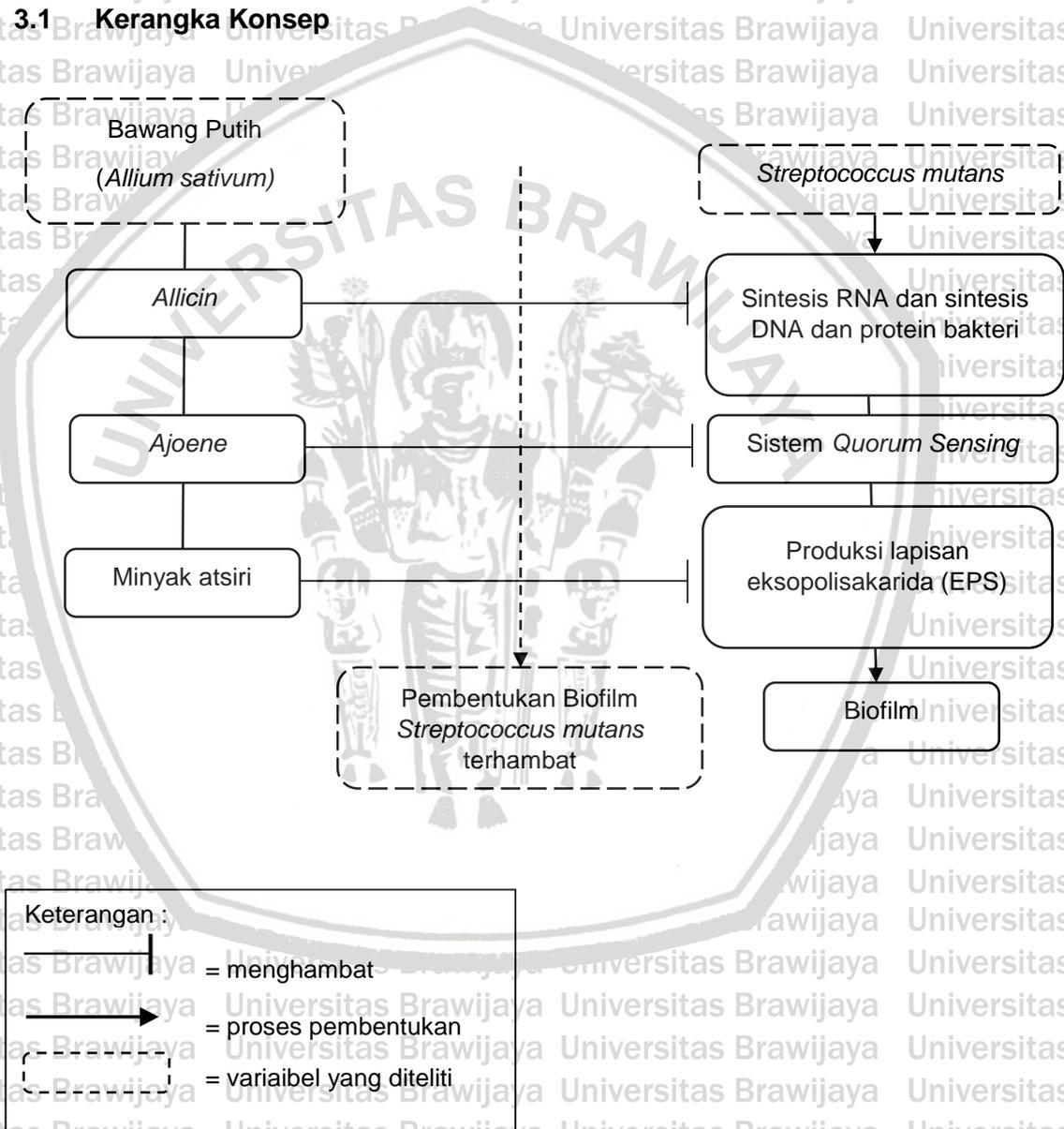
pelarut terkumpul di atas, serta adanya kondensor (suhu dingin) yang menyebabkan uap ini mengembun dan akhirnya jatuh ke tabung penerima (receiver flask). Setelah pelarutnya diuapkan, akan dihasilkan ekstrak yang dapat berbentuk padatan (solid) atau cairan (liquid) (Senjaya, 2008).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

S. mutans membentuk sebuah biofilm yang terbentuk dari melekatnya beberapa bakteri yang hidup bebas di suatu permukaan dan kemudian memperbanyak diri dengan membentuk suatu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Sel biofilm akan menghasilkan EPS yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan dan selanjutnya akan terus tumbuh dan semakin menebal. Dalam perkembangannya, sel-sel bakteri akan mengeluarkan sinyal kimia yang berperan dalam membentuk karakteristik biofilm yang lebih matang. Aksi dari sinyal ini merupakan proses *Quorum Sensing*, yaitu komunikasi antar sel dan kemampuan molekul untuk mencetuskan suatu aksi.

Komponen sulfur utama ekstrak bawang putih, *allicin*, dapat menghambat secara total sintesis RNA bakteri dan menghambat sintesis DNA dan protein bakteri secara parsial. Sedangkan *ajoene* memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme yang sama dengan *allicin*, namun dengan potensi yang lebih kecil. *Ajoene* adalah senyawa bioaktif utama pada ekstrak bawang putih dalam perannya sebagai QSI. Bawang putih juga mengandung komponen minyak atsiri, yang memiliki aktivitas antibakteri sehingga mengakibatkan terganggunya produksi lapisan EPS yang berfungsi menjaga integritas biofilm.

Quorum sensing merupakan system komunikasi yang digunakan oleh bakteri patogen untuk menyesuaikan ekspresi gen spesifik yang terlibat dalam patogenisitas. Untuk *S. mutans*, *quorum sensing* adalah hal yang esensial untuk kompetensi genetik dalam membentuk biofilm. Dengan menghambat sistem *quorum sensing*, kemampuan bakteri untuk berkomunikasi akan berkurang sehingga proses pembentukan biofilm terhambat.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) memiliki potensi sebagai penghambat pembentukan biofilm terhadap *S. mutans*.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan rancangan *true experimental* dengan desain penelitian *post-test only control group design*. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *tub-test* (metode tabung).

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *S. mutans* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat *S. mutans* pembentuk biofilm yang didapat dari Universitas Airlangga. Menurut Federer, jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$(p-1) (n-1) \geq 15$$

$$(6-1) (n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak bawang putih):

Terdapat 6 kelompok dengan 5 kelompok perlakuan P1-P5 yaitu:

Kontrol : 0%

P1-P5 dengan konsentrasi =7%, 8%, 9%, 10%, 11%

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus tersebut, minimal harus dilakukan 4 kali pengulangan pada penelitian ini.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum*). Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 7%, 8%, 9%, 10%, 11% dan kontrol 0%.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah biofilm bakteri *S. mutans* yang diukur dengan metode *tube-test*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli sampai dengan Agustus di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Pembuatan ekstrak bawang putih dilakukan di Fakultas Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

1. Bawang putih (*Allium sativum*)
2. Etanol 96%
3. Timbangan analitik
4. Gelas kimia
5. Rotary Vacuum Evaporator
6. Spatula
7. Kertas saring
8. Oven

4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *S. mutans*
2. Bahan pengecatan Gram: lugol, kristal violet, safranin, dan alkohol 96%
3. Bahan tes katalase: H_2O_2 3%
4. Minyak imersi
5. Mikroskop
6. Ose

7. Object glass
8. Lampu spiritus
9. Tabung reaksi
10. Vitek 2 *compact*

4.5.3. Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. TSB + *glucose*
2. Biakan *S. mutans* pembentuk biofilm
3. Tabung reaksi
4. *Phosphate Buffer Saline (PBS)* pH 7,3
5. *Deionizedwater*
6. Kristal violet
7. Pipet
8. Ose
9. Inkubator

4.6 Definisi Operasional

1. *S. mutans* adalah bakteri gram positif penyebab utama terbentuknya karies pada gigi. Sampel ini diperoleh dari isolat *S. mutans* pembentuk biofilm yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang akan membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm

dibentuk oleh *S. mutans* dengan metode tabung (*tub-test*) dan dilakukan pengukuran MGV dengan *Adobe Photoshop CS6*.

3. Simplisia bawang putih adalah bawang putih segar yang sudah diproses dipotong, dikeringkan, lalu dihaluskan.
4. Ekstrak bawang putih adalah hasil ekstraksi cair bawang putih dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Bawang putih berasal dari Malang.
5. Metode tabung (*tub-test*) adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai medium yang bersifat kualitatif.
6. Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) adalah konsentrasi ekstrak bawang putih terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm yang ditandai dengan terjadinya penipisan bentuk cincin dan lapisan ungu kebiruan yang terdapat pada dinding dan dasar tabung. KHBM merupakan MGV tabung kosong dikurangi 10% MGV tabung kosong.
7. *Mean Gray Value* (MGV) adalah acuan skala intensitas warna yang terdapat pada program *Adobe Photoshop CS6*. Skala berkisar antara 0-255. Angka mendekati 0 menunjukkan kepekatan warna yang tinggi. Sedangkan angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah (Andriyani, 2014).
8. Penelitian Eksplorasi adalah penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentersasi ekstrak yang akan digunakan pada penelitian inti. Konsentersasi yang akan digunakan pada penelitian eksplorasi adalah 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 0%.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*)

Ekstrak bawang putih dibuat dengan ekstraksi maserasi :

1. Sebanyak 500 gram bawang putih terlebih dahulu dikupas kulitnya dan dicuci bersih.
2. Bawang putih dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C dan dihaluskan hingga menjadi serbuk kering.
3. Serbuk kering direndam dalam 2 liter pelarut etanol 96% selama 2x24 jam. Pengadukan pada metode maserasi dilakukan sebanyak 12 kali selama 15 menit.
4. Dilakukan penyaringan untuk memisahkan fitrat dari ampas.
5. Hasil saringan kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga kental untuk memisahkan larutan ekstrak bawang putih dengan pelarut etanol (Karina, 2013).

4.7.2 Identifikasi Bakteri *S. mutans*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

1. *Object glass* dibersihkan dahulu dengan kapas, dilanjutkan fiksasi dengan dilewatkan di atas api dan biarkan dingin sehingga *object glass* menjadi steril dari bahan pencemar lain.
2. Teteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, kemudian suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Khusus sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.

3. Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api satu atau dua kali (Forbes *et al.*, 2007).
4. Tuang kristal violet pada *object glass* dengan durasi 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
5. Tuang lugol pada sediaan selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
6. Tuang alkohol 96% pada sediaan selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas lagi dengan air.
7. Tuang sediaan dengan safranin selama 30 detik. Buang sisa safranin dan bilas lagi dengan air.
8. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap.
9. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x (Cahyani, 2013).

4.7.2.2 Uji Biokimia

Uji biokimia yang dilakukan adalah tes katalase untuk menentukan apakah bakteri tersebut merupakan *Streptococcus* atau *Staphylococcus*. Uji katalase dilakukan dengan cara:

1. Siapkan *object glass* yang sudah disterilisasi.
2. mencampurkan 0,5 ml H_2O_2 3% dengan 1 ose bakteri *S. mutans* pada *object glass*.
3. Amati sediaan, lihat ada atau tidak nya gelembung atau buih.

Streptococcus akan menghasilkan uji katalase negatif, yaitu tidak ada buih atau gelembung udara yang terbentuk pada sediaan sedang hasil positif menunjukkan organisme Staphylococcus (Agustie dan Samsumaharto, 2013).

4.7.2.3 Tes Vitek 2 Compact

Tes Vitek 2 *compact* merupakan pengujian bakteri secara otomatis menggunakan berbagai jenis *card identification*. Setelah sample dimasukkan ke dalam alat, sample akan dianalisis secara otomatis dengan *well* seperti uji biokimiawi yang telah dimodifikasi dan dimasukkan ke dalam *card identification*.

Hasil yang telah dianalisis berupa lembar print hasil identifikasi dengan keterangan sebagai berikut :

1. Tipe *card*, *number cassette*, status, dan tanggal pengujian
2. Organisme yang berhasil di identifikasi
3. Presentase kebenaran (*probability*)
4. *Biochemical details*

Hasil yang diperoleh dinyatakan dengan prosentase dan kebenaran organisme yang berhasil di identifikasi. Jika $\%probability > 85\%$, hasil tersebut masih dapat diterima. Jika $\%probability < 85\%$, bakteri yang teridentifikasi masih meragukan dan harus diulang kembali dalam pemurnian (Setyawan, 2016).

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair *S. mutans*

1. Inokulum *S. mutans* diambil 2 ml, kemudian dimasukkan ke dalam 20 ml media TSB + *glucose* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

2. Kemudian diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 625 nm dan jumlah sel yang digunakan disetarakan dengan 10^8 /mL.

3. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^7 /mL sebanyak 10 ml maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

$$V1.N1 = V2.N2$$

Keterangan:

V1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)

N2 = OD (0,1 = setara dengan 10^8 /mL)

Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer

untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^7 /ml sebanyak 10 mL

4.7.4 Uji Pembentukan Biofilm (Metode Tube-test)

S. mutans yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media TSB + *glucose* dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung sebanyak 4 ml dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam.

Selanjutnya tabung dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water* hingga akhirnya tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya. Formasi biofilm ini ditandai dengan adanya cincin

berwarna ungu kebiruan yang melekat pada dinding tabung (Christensen *et al.*, 2000).

4.7.5 Uji Hambat Pembentukan Biofilm (Metode Tube-test)

4.7.5.1 Uji Pendahuluan

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml.
2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glucose* berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Menyiapkan enam tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan untuk uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 3,125%, 6,25%; 12,5%; 25%; 50%.
4. Mengisi tabung reaksi 1 dengan suspensi bakteri sebanyak 4 ml, tabung 2-6 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glucose* dan ekstrak bawang putih sesuai dengan hasil perhitungan sebagai berikut :

Tabel 4.1 Hasil Perhitungan Konsentrasi, Volume Ekstrak, dan Suspensi Bakteri Uji Pendahuluan

Konsentrasi	Volume Ekstrak	Suspensi Bakteri
0%	0 ml	4 ml
3,125%	0,125 ml	3,875 ml
6,25%	0,25 ml	3,75 ml
12,5%	0,5 ml	3,5 ml
25%	1 ml	3 ml
50%	2 ml	2 ml

5. Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C

6. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya.
7. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 4 ml lalu setelah 20 menit dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.
8. Tabung dikeringkan.
 Segera amati dan catat biofilm yang terbentuk. Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi tabung. Hal ini diyakini sebagai indikasi pembentukan biofilm (Prahara *et al.*, 2013).

4.7.5.2 Penelitian Inti

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml.
2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glucose* berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Menyiapkan tujuh tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan untuk penelitian inti, yaitu 0% (kontrol); 7%; 8%; 9%; 10%; 11%.
4. Mengisi tabung reaksi 1 dengan suspensi bakteri sebanyak 4 ml, tabung 2-6 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glucose* dan ekstrak bawang putih sesuai dengan hasil perhitungan sebagai berikut :

Tabel 4.2 Hasil Perhitungan Konsentrasi, Volume Ekstrak, dan Suspensi Bakteri Penelitian inti

Konsentrasi	Volume Ekstrak	Suspensi Bakteri
0%	0 ml	4 ml
7%	0,28 ml	3,72 ml
8%	0,32 ml	3,68 ml

9%	0,36 ml	3,64 ml
10%	0,4 ml	3,6 ml
11%	0,44 ml	3,56 ml

6. Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C
7. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya.
8. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 4 ml lalu setelah 20 menit dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.
9. Tabung dikeringkan.
10. Segera amati dan catat biofilm yang terbentuk. Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi tabung. Hal ini diyakini sebagai indikasi pembentukan biofilm (Prahara et al., 2013).

4.7.6 Pengukuran Mean Gray Value

Hasil pembentukan biofilm pada tabung kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok menggunakan *Mean Gray Value* (MGV). Pengukuran intensitas warna biofilm menggunakan MGV ini telah diulas dalam beberapa jurnal salah satunya yaitu "*Heterotrophic Pioneers Facilitate Phototrophic Biofilm Development*" Department of Biotechnology, Delft University of Technology, The Netherlands yang mengulas bahwa intensitas warna biofilm yang terbentuk dapat dihitng secara kuantitatif melalui hasil foto biofilm dengan kamera digital dan ditentukan mean dan standar deviasi pada *gray value* melalui measurement tool (G. Roeselers et al., 2007). Aplikasi Adobe photoshop CS6 mampu mengukur mean gray value melalui measurement tool dan MGV

dinyatakan dalam skala 0 – 255, semakin rendah nilai MGJV menunjukkan intensitas warna yang semakin gelap, sementara semakin tinggi nilai MGJV menunjukkan intensitas warna yang semakin terang. Langkah-langkah dimulai dengan membuka aplikasi *Adobe Photoshop CS6*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung (Andiyani, 2014).

4.8 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan variabel numerik untuk mengetahui pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) terhadap intensitas warna yang ditimbulkan oleh biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*) dan untuk mengetahui hubungan antara masing-masing konsentrasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap intensitas warna biofilm pada tabung. Analisis data dilakukan dengan menggunakan *IBM Statistic SPSS* (*Statistical Product of Service Solution*) untuk *windows* versi 11.0. Langkah-langkah pengujian sebagai berikut :

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik) dan homogen atau tidak homogen. *Shapiro-Wilk test* dilakukan apabila data berjumlah kurang dari 50 data.
2. Uji komparasi dilakukan dengan cara :

a. ANOVA, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).

b. Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka digunakan metode *Kruskal Wallis*.

3. Uji Post Hoc dilakukan dengan cara :

a. *Tuckey*, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).

b. Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Mann Whitney*.

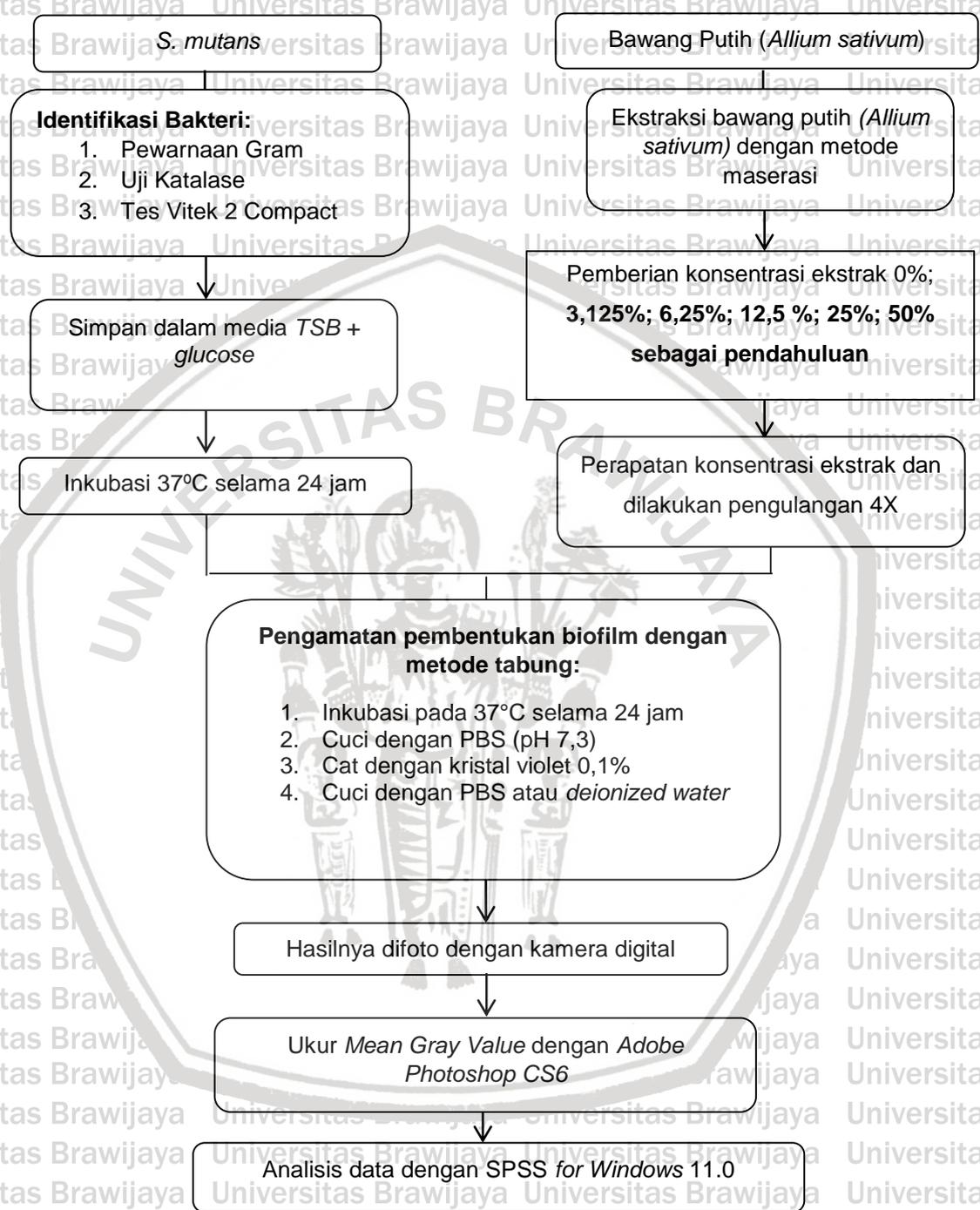
4. Uji Korelasi dilakukan dengan cara :

a. *Pearson*, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).

b. Namun, bila data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Spearman*.

5. Uji Regresi dilakukan untuk mengetahui pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen setelah diketahui ada hubungan bermakna antara kedua variabel penelitian.

4.9 Rancangan Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Rancangan Operasional Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Bawang Putih (*Allium sativum*)

Bawang putih terlebih dahulu dikupas kulitnya dan dicuci bersih, selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C, lalu dihaluskan hingga menjadi serbuk kering atau simplisia. Simplisia bawang putih ini kemudian direndam dalam 2 liter pelarut etanol 96% selama 2x24 jam dan diambil filtratnya dengan penyaringan. Pengadukan pada metode maserasi dilakukan sebanyak 12 kali selama 15 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan fitrat dari ampas. Hasil saringan kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sampai kental sehingga didapatkan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 100% (Karina, 2013).

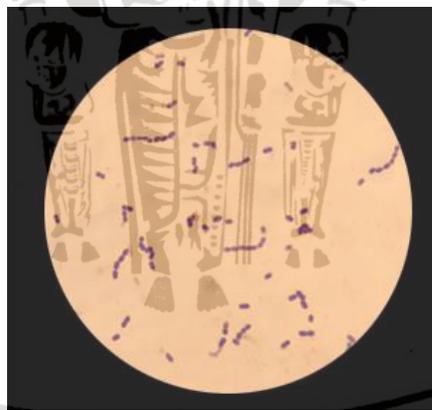


Gambar 5.1 Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*)

5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri

Bakteri yang digunakan merupakan *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga. Identifikasi diawali dengan pewarnaan gram, dilanjutkan dengan uji katalase, dan Vitek 2 compact. Hasil pewarnaan gram menunjukkan bakteri gram positif berbentuk coccus berantai seperti terlihat pada gambar 5.2. Identifikasi dilanjutkan dengan uji katalase dan didapatkan hasil negatif (tidak ada gelembung atau buih) seperti gambar 5.3. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan *Streptococcus*.

Uji biokimia dengan menggunakan Vitek 2 compact dilakukan untuk mengkonfirmasi spesies *Streptococcus*. Hasil identifikasi menunjukkan prosentase kebenaran sebesar 98% (*excellent*) dapat dilihat pada gambar 5.4. Hal ini memperkuat kesimpulan bahwa bakteri yang diteliti merupakan *S. mutans*.



Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram

Keterangan: Bakteri *S. mutans* dengan pengecatan gram, didapatkan hasil bakteri berwarna ungu (gram positif) membentuk rantai



Gambar 5.3 Hasil Uji Katalase

Keterangan: Hasil negatif, tidak terbentuk gelembung atau buih

BBLK Surabaya

Laboratory Report

Printed May 7, 2018 16:48 ICT
Printed by labsuper

bioMérieux Customer:
System #: 3187

Patient Name: GA-B12
Isolate Group: GA-B12

Card Type: GP Testing Instrument: 0000EEA51C1 (3187)

Bionumber: 140011364753531
Organism Quantity:

Comments:

Identification Information	Card:	GP	Lot Number:	2420561103	Expires:	Jun 10, 2019 12:00 ICT
	Completed:	May 7, 2018 16:55 ICT	Status:	Final	Analysis Time:	6.25 hours
Selected Organism	98% Probability	Streptococcus mutans			Confidence:	Excellent identification
SRF Organism	Analysis Organisms and Tests to Separate:					
Analysis Messages:						
Contraindicating Typical Biopattern(s) Streptococcus mutans TyrA(23).						

Gambar 5.4 Hasil Vitek 2 Compact

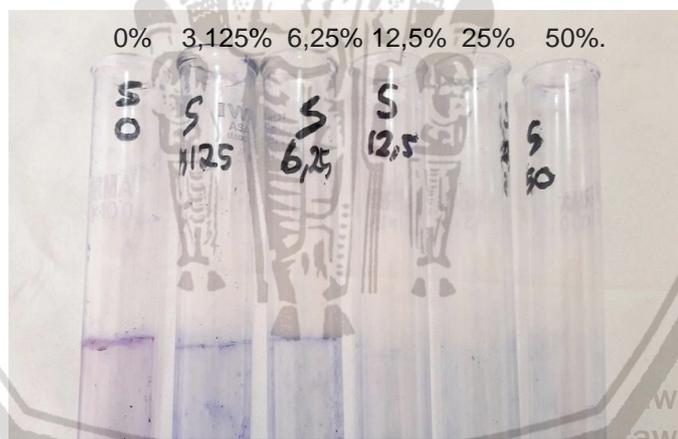
Keterangan: Hasil menunjukkan *probability* sebesar 98% (*excellent identification*) bahwa bakteri yang diuji merupakan *S. mutans*.

5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Uji pendahuluan dilaksanakan sebelum penelitian inti dengan tujuan menentukan konsentrasi yang akan dipakai. Konsentrasi yang digunakan, yaitu

0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan secara visual bahwa biofilm *S. mutans* terhambat pada konsentrasi 12,5% dan pada konsentrasi 25% dan 50% sudah tidak terlihat adanya cincin biofilm. Penelitian ini kemudian dilakukan dengan melakukan perapatan konsentrasi menjadi enam konsentrasi yaitu, 7%, 8%, 9%, 10%, dan 11%. Perlakuan 0% merupakan kelompok kontrol bakteri yang menggunakan media TSB + *glucose* tanpa pemberian ekstrak.

Data yang didapatkan dari penelitian ini berupa foto yang kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan mengukur intensitas warna cincin biofilm melalui penghitungan *Mean Gray Value* (MGV). Secara visual, dilihat dari gambar 5.5, ditemukan bahwa secara umum warna cincin biofilm semakin tidak pekat seiring dengan tingginya konsentrasi ekstrak bawang putih.



Gambar 5.5 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pendahuluan

Keterangan: Tampak bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, warna cincin semakin memudar dan menghilang pada konsentrasi 12,5%; 25%; dan 50%

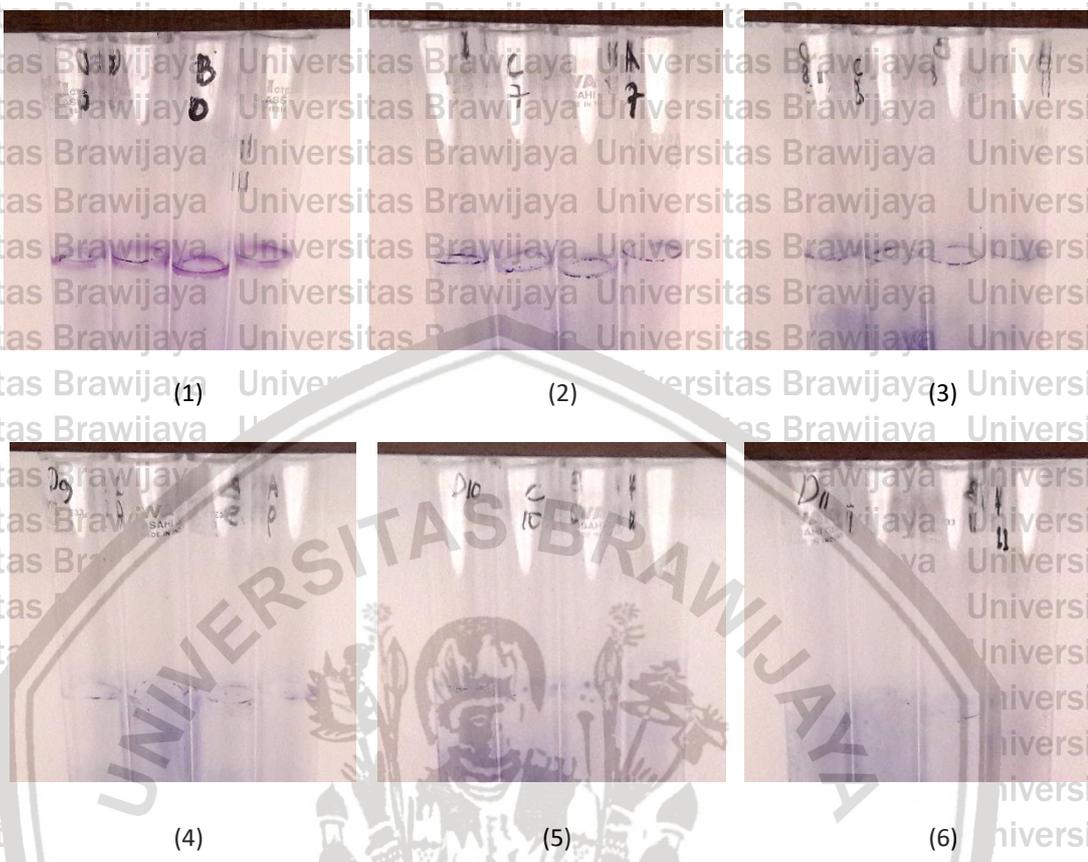
Setelah itu, dilakukan pengukuran MGV menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop CS6* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Pengukuran MGV juga dilakukan pada tabung yang masih baru untuk melihat nilai awal MGV tabung kosong untuk tabung yang digunakan. Apabila *Mean Gray Value* pada kelompok

perlakuan lebih kecil 10% dari MGV tabung kosong yang masih baru, maka konsentrasi pada kelompok tersebut merupakan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM). Penilaian pada tabung kosong menunjukkan nilai MGV sebesar 165,72. Nilai ini kemudian dibandingkan dengan nilai MGV kelompok perlakuan.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Mean Gray Value dengan Aplikasi Adobe Photoshop CS6

Konsentrasi	Pengulangan				Mean ± SD
	I	II	III	IV	
0%	119.85	105.22	112.15	117.79	113.7525
7%	128.43	136.64	130.83	122.72	129.655
8%	148.07	146.67	135.27	140.70	142.6775
9%	151.67	148.29	142.50	146.27	147.1825
10%	158.35	151.87	156.80	152.76	154.945*)
11%	160.51	156.59	159.13	157.55	158.445
Mean Gray Value Tabung kosong	165.72				

*) merupakan KHBM karena nilai berada dalam rentang 10% dari Mean Gray Value tabung kosong (165.72).

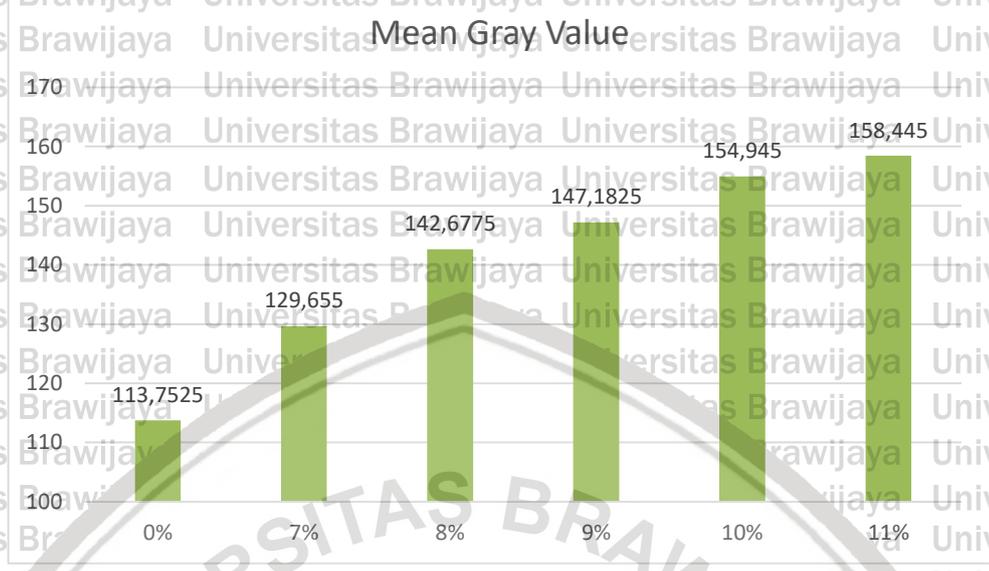


Gambar 5.6 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan 1 – 4

Keterangan:

- (1) konsentrasi 0%,
- (2) konsentrasi 7%,
- (3) konsentrasi 8%,
- (4) konsentrasi 9%,
- (5) konsentrasi 10%,
- (6) konsentrasi 11%

Secara visual, dapat terlihat bahwa cincin biofilm semakin menipis dengan penambahan konsentrasi dan tidak nampak pada konsentrasi 11%.



Gambar 5.7 Grafik Pengukuran Mean Gray Value

Keterangan: Terjadi peningkatan Mean Gray Value (MGV) bersamaan dengan penambahan konsentrasi

5.2 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan aplikasi analisis statistik SPSS versi 11.0 untuk Windows. Pertama, dilakukan pengujian normalitas dan homogenitas dari hasil Mean Gray Value yang didapat pada tabel 5.1. Didapatkan hasil MGV rata-rata pada konsentrasi 0% sebesar 113,75; konsentrasi 7% sebesar 129,65; konsentrasi 8% sebesar 142,67; konsentrasi 9% sebesar 147,18; konsentrasi 10% sebesar 154,94; konsentrasi 11% sebesar 158,44. Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) dapat ditemukan pada konsententrasi 10%, karena pada tabung didapatkan MGV lebih dari 149,148 (MGV tabung kosong dikurangi 10% MGV tabung kosong). Lalu dilakukan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene* untuk menganalisis normalitas dan homogenitas data. Kemudian dilanjutkan dengan uji komparasi dengan menggunakan uji *Oneway ANOVA* untuk memastikan adanya

perbedaan yang signifikan antara kelompok data. Setelah itu, dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test multiple comparision test* metode *Tukey* untuk mengetahui signifikansi suatu kelompok data terhadap masing – masing kelompok data lainnya. Terakhir, dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak bawang putih terhadap *Mean Gray Value*.

5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Suatu data dianggap tersebar normal bila hasil uji normalitas menunjukkan $p > 0,05$ dan dianggap homogen jika hasil uji homogenitas menunjukkan $p > 0,05$.

Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai $p = 0,200$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Lalu, didapatkan hasil uji homogenitas *Levene* dengan nilai $p = 0,216$ yang menunjukkan bahwa data bervarian sama atau homogen. Berdasarkan hasil ini dapat dilakukan uji statistik parametrik.

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas dengan Metode *Shapiro-Wilk*

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MGV	.142	24	.200*	.944	24	.200

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas dengan Metode *Levene*

MGV			
Levene Statistic	df1	df2	df3
1.578	5	18	216

5.2.2 Hasil Uji *Oneway ANOVA*

Uji *Oneway ANOVA* dilakukan untuk mengetahui tingkat perbedaan antara rerata tiap kelompok dalam keseluruhan data yang telah didapatkan. Data dianggap berbeda signifikan bila $p < 0,05$. Hasil uji menunjukkan nilai $p = 0,000$ (kurang dari 0.05), maka disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara rerata tiap kelompok dan signifikan.

Tabel 5.4 Hasil Uji *Oneway ANOVA*

MGV	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5643.566	5	1128.713	48.982	.000
Within Groups	414.782	18	23.043		
Total	6058.348	23			

5.2.3 Hasil Uji *Post Hoc Multiple Comparison*

Uji *Post Hoc Multiple Comparison* dilakukan untuk mengetahui perbandingan rata – rata secara signifikan dalam jumlah analisis varian. Bila nilai $p > 0,05$, maka dapat diartikan bahwa rata – rata adalah sama dan perbedaan rata – rata tidaklah signifikan. Uji ini tidak wajib dilakukan apabila hasil *Oneway ANOVA* tidak signifikan, namun dalam penelitian ini, uji ini dilakukan untuk memastikan kembali ada tidaknya perbedaan antar tiap-tiap kelompok perlakuan dalam penelitian. Tabel 5.5. dan Tabel 5.6. menggambarkan hasil perbandingan nilai p setiap kelompok konsentrasi terhadap konsentrasi lainnya. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara dua kelompok perlakuan.

Tabel 5.5 Hasil Uji Post Hoc Multiple Comparison

	0%	7%	8%	9%	10%	11%
0%		0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
7%	0,002		0,013	0,001	0,000	0,000
8%	0,000	0,013		0,767	0,021	0,002
9%	0,000	0,001	0,767		0,249	0,038
10%	0,000	0,000	0,021	0,249		0,901
11%	0,000	0,000	0,002	0,038	0,901	

Tabel 5.6 Rangkuman Hasil Uji Post Hoc Multiple Comparison

	0%	7%	8%	9%	10%	11%
0%		+	+	+	+	+
7%	+		+	+	+	+
8%	+	+		-	+	+
9%	+	+	-		-	+
10%	+	+	+	-		-
11%	+	+	+	+	-	

Keterangan:

+ = $p < 0,05$

- = $p > 0,05$

Berdasarkan kedua tabel di atas, dapat dilihat bahwa terdapat dua kelompok dengan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) dan beberapa kelompok memiliki perbedaan rata-rata yang tidak signifikan ($p > 0,05$).

5.2.4 Uji Korelasi Pearson

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui keeratan dan bentuk hubungan antara dua variabel yang dinyatakan dengan koefisien korelasi. Hubungan signifikan ditunjukkan dengan $p < 0,05$ menunjukkan bahwa korelasi signifikan.

Tabel 5.7 Hasil Uji Korelasi Pearson

		Konsentrasi	MGV
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	.923**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	24	24
MGV	Pearson Correlation	.923**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji yang dilakukan, didapatkan hasil nilai $p=0,000$ dengan nilai korelasi 0,923. Adapun klasifikasi nilai korelasi Pearson sebagai berikut :

Nilai Korelasi 0 = tidak ada korelasi antara dua variabel

Nilai Korelasi $> 0 - 0,25$ = sangat lemah

Nilai Korelasi $> 0,25 - 0,5$ = cukup

Nilai Korelasi $> 0,5 - 0,75$ = kuat

Nilai Korelasi $> 0,75 - 0,99$ = sangat kuat

Nilai Korelasi 1 = sempurna

Korelasi dapat bertanda positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang searah antar variabel. Sedangkan korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan hasil-hasil sebagai berikut:

1. Nilai korelasi (r) = 0,923, yang berarti korelasi antara konsentrasi ekstrak bawang putih dengan *Mean Gray Value* atau ketebalan biofilm sangat kuat.
2. Arah korelasi positif, sehingga disimpulkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak bawang putih, semakin tinggi pula nilai *Mean Gray Value* yang menandakan semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk.
3. Nilai p = 0,000, yang menandakan terdapat korelasi yang signifikan antara konsentrasi ekstrak bawang putih dengan *Mean Gray Value*.

5.2.5 Uji Regresi

Uji Regresi dilakukan untuk mengukur besarnya pengaruh variabel bebas terhadap variabel tergantung. Dimana rumus persamaan regresi linear sederhana adalah :

$$Y = a + bX$$

Keterangan:

Y = Mean Gray Value

a = angka konstan dari unstandardized coefficients

b = angka koefisien regresi

X = Konsentrasi

Tabel 5.8 Hasil Uji Regresi

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients		t	Sig.
		B	Std. Error	Beta			
1	(Constant)	110.523	3.025			36.523	.000
	Konsentrasi	4.078	.364	.923		11.211	.000

a. Dependent Variable: MGV

Tabel 5.9 Hasil R Square

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.923 ^a	.851	.844	6.40487

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

Uji regresi yang dilakukan menghasilkan nilai a=110,523; b=4,078; Apabila data ini dimasukkan pada rumus $Y = 110,523 + (4,078x1)$, maka didapatkan hasil 114,601. Berdasarkan nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa penambahan konsentrasi ekstrak etanol sebanyak 1% akan menaikkan nilai Mean Gray Value menjadi 110,564. Nilai *R square* dari uji regresi didapatkan sebesar 0,851 yang berarti bahwa terdapat kemungkinan sebesar 85% hambatan pembentukan biofilm yang dipengaruhi oleh pemberian ekstrak bawang putih dan sisanya dipengaruhi oleh *confounding factor*.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga. *S. mutans* ditanam pada tabung yang diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*). Ekstrak bawang putih yang digunakan didapatkan dari Materia Medika Batu berupa simplisia bawang putih sebanyak 500 gr yang kemudian diekstraksi di Fakultas Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang dengan menggunakan metode maserasi. Proses pengerjaan dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut etanol 96%. Etanol akan menembus dinding sel bawang putih dan masuk ke dalam rongga sel, perbedaan konsentrasi akan mendesak zat aktif keluar. Kelebihan metode ini, yaitu peralatan dan prosedur yang dilakukan sederhana (Pratiwi, 2010). Etanol biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa aktif, beberapa penelitian melaporkan bahwa pelarut etanol lebih baik dari pada air, metanol maupun pelarut lain dalam mengekstraksi senyawa antioksidan maupun antibakteri (Hirasawa, 1999).

Sebelum dilakukan penelitian dilaksanakan uji indentifikasi bakteri yaitu pengecatan gram, uji katalase, dan tes Vitek 2 *compact*. Hasil pengecatan gram menunjukkan bakteri berwarna ungu, yaitu gram positif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan yang terletak di luar membran plasma. Ketika sediaan ditetesi kristal violet lalu kemudian iodin, warna ungu dari kristal violet ini akan ditahan oleh struktur peptidoglikan bakteri. Kemudian ketika

sediaan ditetesi alkohol zat warna ungu tersebut akan sulit untuk terhapus sehingga bakteri berwarna ungu (Willey *et al.*, 2008).

Uji katalase menunjukkan hasil negatif, yaitu tidak terlihat adanya gelembung. Bakteri aerob dan fakultatif anaerob memproduksi dua toksin sebagai hasil metabolisme normal, yaitu *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *superoxide radical* (O_2^-). Bakteri memiliki dua enzim untuk detoksifikasi dua produk tersebut, salah satunya enzim katalase yang dapat mengubah hydrogen peroxide menjadi air dan oksigen (gelembung). Hasil uji yang negatif menunjukkan tidak adanya enzim katalase dan bakteri tersebut merupakan *Streptococcus sp.* (Tille, 2015).

Kemudian, tes Vitek 2 *compact* yang menunjukkan prosentase kebenaran sebesar 98% (*excellent*) memperkuat kesimpulan bahwa bakteri yang diteliti merupakan *S. mutans*.

Uji hambat pembentukan biofilm pada penelitian ini dilakukan dengan metode dilusi tabung karena ekstrak yang digunakan kasar dan tidak dapat digunakan untuk metode *microtiter*. Dengan metode dilusi tabung pembentukan cincin biofilm dapat terlihat langsung di *airfluid border* pada dinding tabung.

Sebelum dilaksanakannya penelitian inti, dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentersasi yang akan digunakan pada penelitian inti. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan secara visual bahwa biofilm *S. mutans* terhambat pada konsentrasi 12,5% dan pada konsentrasi 25% dan 50% sudah tidak terlihat adanya cincin biofilm.

Penelitian inti kemudian dilakukan dengan melakukan perapatan konsentersasi menjadi 6 konsentersasi yaitu, 7%, 8%, 9%, 10%, dan 11%. Hasil penelitian inti menunjukkan penghambatan biofilm secara visual terlihat pada

konsentersasi 10% yang ditandai dengan tidak terbentuknya cincin pada *airfluid border* tabung. Sedangkan, pada tabung kontrol terlihat cincin ungu yang sangat tebal pada *air fluid border* yang menunjukkan pembentukan biofilm terjadi tanpa hambatan.

Data yang didapatkan dari penelitian ini berupa foto yang kemudian dianalisis secara kuantitatif dengan mengukur intensitas warna cincin biofilm melalui penghitungan *Mean Gray Value* (MGV). Secara visual ditemukan bahwa secara umum, warna cincin biofilm semakin tidak pekat seiring dengan tingginya konsentrasi ekstrak bawang putih. Setelah itu, dilakukan pengukuran MGV dengan menggunakan program *Adobe Photoshop CS6* yang menunjukkan adanya kenaikan rata-rata MGV yang berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi ekstrak etanol bawang putih. Peningkatan rata-rata MGV menunjukkan intensitas warna cincin biofilm yang semakin mendekati putih. Hal itu menandakan semakin tipisnya biofilm yang terbentuk.

Didapatkan hasil MGV rata-rata pada konsentrasi 0% sebesar 113,75; konsentrasi 7% sebesar 129,65; konsentrasi 8% sebesar 142,67; konsentrasi 9% sebesar 147,18; konsentrasi 10% sebesar 154,94; konsentrasi 11% sebesar 158,44. Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) dapat ditemukan pada konsentersasi 10%, karena pada tabung didapatkan MGV lebih dari 149,148 (MGV tabung kosong dikurangi 10% MGV tabung kosong). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) memiliki potensi sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *S. mutans* dengan KHBM pada konsentrasi 10%.

Penelitian ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Wangi (2017), dalam penelitiannya mengenai efek ekstrak bawang putih terhadap pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil penelitian menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi bawang putih yang diberikan, inhibisi yang dihasilkan akan semakin tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan biofilm juga semakin meningkat.

Penelitian lain oleh Birring (2015), menunjukkan bahwa konsentersasi ekstrak bawang putih sebesar 70% dapat mengurangi pertumbuhan *Enterococcus faecalis* sekaligus menghambat pembentukan biofilm bakteri. Konsentersasi optimal dalam penghambatan biofilm berbeda, hal ini disebabkan karena bakteri dan metode penelitian yang berbeda. Pada penelitian ini dilakukan penghambatan pertumbuhan biofilm secara *in vitro* pada gigi dengan menggunakan ekstrak bawang putih yang didapatkan melalui proses penyaringan menggunakan kain kasa.

Studi mengenai efek ekstrak bawang putih terhadap pembentukan biofilm pada enam bakteri patogen oleh Mohsenipour (2015) memberikan hasil efektif. Penelitian dilakukan pada tiga bakteri gram positif dan tiga bakteri gram negatif. Hasil menunjukkan efek penghambatan pertumbuhan biofilm secara langsung berkorelasi dengan peningkatan ekstrak bawang putih yang diberikan. Daya hambat pembentukan biofilm paling tinggi di dapat pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Streptococcus pneumonia* yang keduanya merupakan bakteri gram positif.

Efek *allicin* (*diallyl thiosulfinate*) yang merupakan bahan aktif dalam bawang putih berperan penting dalam penghambatan pembentukan biofilm. Sebuah penelitian menggunakan *Allicin* sebagai pengambat biofilm *Staphylococcus*

epidermidis dengan metode *microtiter plate* memberikan hasil efektif. Hasil memperlihatkan efek *allicin* sebagai penghambat biofilm, kemampuan ini membuktikan bahwa *allicin* sendiri atau dikombinasikan dengan antibiotik dapat mencegah terjadinya infeksi (Cruz-Villalón, G., & Pérez-Giraldo, 2016).

Ajoene memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme yang sama dengan *allicin*, namun dengan potensi yang lebih kecil. Ajoene dianggap sebagai *Quorum Sensing Inhibitor* (QSI) utama yang terkandung di dalam bawang putih. Jakobsen *et al.* (2012) menyebutkan bahwa treatment menggunakan ajoene terhadap biofilm secara *in vitro* terbukti sinergis dengan efek antimikrobal dari tobramycin.

Minyak atsiri dilaporkan dapat membunuh mikroorganisme dengan merusak dinding sel dan menghambat aktivitas enzim sehingga dapat mencegah agregasi bakteri. Hasil penelitian Hertiani (2011) menunjukkan bahwa minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan biofilm *S. mutans*. Pada hasil penelitian yang lain dikemukakan bahwa penambahan kombinasi minyak atsiri pada sediaan mouthwash dapat meningkatkan aktivitas penghambatan plak-biofilm (Pan *et al.*, 2003).

Penelitian ini selaras dengan penelitian sebelumnya mengenai efek kandungan bawang putih, yaitu *Allicin*, *ajoene*, dan minyak atsiri. Hasil Penelitian ini membuktikan bahwa kandungan ekstrak bawang putih dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *S. mutans* secara *in vitro*. Manfaat klinis dari penelitian ini adalah penggunaan bawang putih sebagai alternatif pencegahan dan terapi terhadap infeksi *S. mutans*. Diharapkan pembentukan biofilm *S. mutans* dapat

dihambat sehingga dapat mengurangi prevalensi penyakit serta mencegah terjadinya resistensi antibiotik.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah pengamatan yang hanya dilakukan setelah masa inkubasi selesai (24 jam), tidak dilakukan sepanjang waktu dan secara *real time*. Oleh karena itu belum dapat dilihat dengan detail proses pembentukan biofilm secara langsung. Selain itu, terdapat beberapa faktor perancu yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Salah satunya, yaitu ekstrak bawang putih yang berupa pasta. Pada saat masa inkubasi beberapa partikel ekstrak menempel di dinding tabung sehingga sulit untuk dibersihkan dan dapat menyebabkan cincin biofilm putus. Jika tabung tidak dicuci dengan baik, partikel ekstrak dapat ikut berwarna dan menyulitkan pengamatan cincin biofilm secara visual, sehingga perlu dieksplorasi kembali metode ekstraksi untuk bawang putih yang digunakan untuk uji biofilm ke depannya.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) memiliki potensi sebagai penghambat pembentukan biofilm *S. mutans* secara *in vitro*.
2. Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) dari ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S. mutans* secara *in vitro* adalah pada konsentrasi 10%.
3. Terdapat pengaruh yang signifikan antara peningkatan konsentrasi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) terhadap penghambatan biofilm *S. mutans*.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil dan proses penelitian, saya menyarankan hal-hal sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian untuk uji klinis selanjutnya secara *in vivo* untuk mengetahui farmakokinetik dan farmakodinamik ekstrak bawang putih.
2. Perlu dicari metode ekstraksi bawang putih dengan konsentersasi 100% namun dengan hasil yang lebih halus tanpa partikel yang dapat menempel ke dinding tabung.

3. Perlu dikembangkan penelitian yang menggunakan ekstrak bawang putih dalam menghambat biofilm bakteri lainnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Adrianto, A.D., 2012. Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha* Wight) Dalam Pasta Gigi Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*.
- Agustie, A. W. D., & Samsuharto, R. A. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Maserasi Daun Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Biomedika*, 6(2), 14-19
- Amagase, H., B.L. Petesch, H. Matsuura, S. Kasuga, dan Y. Itakura. 2001. Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *The Journal of Nutrition* 131:955S-962S
- Amagase, Harunobu. 2006. Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. *The Journal of Nutrition* 136: 716S-725S.
- Andiyani, P. D. Z., & Hidayati, D. Y. N. 2013. Efektivitas test of Red Ginger (*Zingiber officinalis* var *Rubra*) to biofilm inhibition of *Staphylococcus aureus* bacteria in vitro.
- Ankri S, Mirelman D. 1999 *Antimicrobial Properties of Allicin From Garlic*. *Microbes and Infection*, (25) November, pp. 125-129.
- Ardani, M., Pratiwi, S.U.T. and Hertiani, T., 2010. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(3), pp.191-201.
- Armitage JP. Understanding The Development and Formation of Biofilm. 2005. <http://www.maths-in-medicine.org/uk/2005/biofilm/>
- Birring, O. J., Vilorio, I. L., & Nunez, P. 2015. Anti-microbial efficacy of *Allium sativum* extract against *Enterococcus faecalis* biofilm and its penetration into the root dentin: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 26(5), 477.
- Banerjee, P., Singh, M., Sharma, V. 2005. Biofilm Formation: A Comprehensive Review. Department of Botany & Biotechnology, Sadhu Vaswani College, Bhopal-462030, India. 3(2). 556-560.
- Cahyani, L., 2013. Pemanfaatan Tepung Cangkang Udang Sebagai Media Produksi Kitinase Oleh Bakteri Kitingolitik Isolat 26.
- Cruz-Villalón, G., & Pérez-Giraldo, C. 2016. Inhibition of Biofilm By Allicin in *Staphylococcus epidermidis*: The Distance Effect. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 3(3).
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. *Biofilm : Survival Mechanism of Clinically relevant Microorganism*. *Clin Microbial Rev*;15,167-193
- Facklam, R. 1975. *Public Health Image Library*. (Online), (http://www.phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=1045#modalIdString_imgURL 1, diakses 3 Januari 2018)
- Fani, M.M, Kohanteb, M.J. and Dayaghi. 2007. Inhibitory activity of garlic (*Allium*

- sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent*. 164-168.
- Fatmawati, D. W. A. 2011. Hubungan Biofilm *Streptococcus mutans* Terhadap Resiko Terjadinya Karies Gigi. *Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember*, 8(3), 127-30.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S., 2007. Bailey & Scott's. *Diagnostic microbiology*. 12th edition, Mosby Elsevier.
- Gibbons, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural product reports*, 21(2), pp.263-277.
- Gunardi, W. D. 2014. Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 15(39A).
- Hamada, S., and H. D. Slade. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*44:331-384.
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia. Terbitan ke-II*. a.b. Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
- Hargono, D. dkk., 1986. Sediaan Galenik, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM), Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Hernawan, U.E. and Setyawan, A.D., 2003. Senyawa organo-sulfur bawang putih (*Allium sativum* L.) dan aktivitas biologinya. *Biofarmasi*, 1(2), pp.65-76.
- Hidayahti, N., 2010. *Isolasi dan identifikasi jamur endofit dari umbi tanaman bawang putih sebagai antibakteri terhadap bakteri Streptococcus mutans dan bakteri Esherichia coli* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Hirasawa M, et al., 1999. *The Kinds of Antibacterial Substances from Lentinus adobes Singshitake an Edible Mushroom*, *International Journal of Antibacterial Agents* 11:1561-157.
- Huang, R., Li, M., & Gregory, R. L. 2011. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435-444.
- Jakobsen, T.H., van Gennip, M., Phipps, R.K., Shanmugham, M.S., Christensen, L.D., Alhede, M., Skindersoe, M.E., Rasmussen, T.B., Friedrich, K., Uthe, F. and Jensen, P.Ø., 2012. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), pp.2314-2325.
- Jawetz, Melnick, Adelberg. 2013. *Medical microbiology*. 26th Edition. USA: Mc Graw Hill Company
- Karina, R. 2013. Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans* secara In Vitro. <http://repository.uinjkt.ac.id/dspace/handle/123456789/26406>
- Kemper and Kathi, J. 2000. *Garlic (Allium sativum)*. Longwood Herbal Task

Force, pp: 1-30.

Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., & Skalniak, A. 2014. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(4), 499-515.

Li, Y.H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C., Lee, J.H., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G., 2002. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 184(10), pp.2699-2708.

Listyasari, N. A., & Santoso, O. 2012. *Pengaruh Pasta Gigi Dengan Kandungan Propolis Terhadap Pembentukan Plak Gigi* (Doctoral dissertation, Fakultas Kedokteran).

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian journal of medical microbiology*, 24(1), 25.

Michalek M Suzanne, Noel K Childers. Development and outlook for caries vaccine. *Crit. Rev Oral Biol. Med.* 1990; 1: 37-51

Mohsenipour, Z., & Hassanshahian, M., 2015. The Effects of *Allium sativum* Extracts on Biofilm Formation and Activities of Six Pathogenic Bacteria. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(8).

Monroe, D., 2007. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS biology*, 5(11), p.e307.

Nichols, W.W., Dorrington, S.M., Slack, M.P. and Walmsley, H.L., 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(4), pp.518-523.

Nugraha, A. W. 2008. *Streptococcus mutans* Si Plak Dimana–mana. Artikel Ilmiah Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.

O'Toole, G. A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (47).

Pan, P. H., Finnegan, M. B., Sturdivant, L., and Barnett, M. B., 2003, Comparative Antimicrobial Activity of an Essential Oil and an Amine Fluoride/Stannous Fluoride Mouthrinse In Vitro, *J. of Clinical Periodontology*, 26 (7), 474-476

Permanasari, D.A., **AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN CINCAU HIJAU (*Cyclea barbata* Miers) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM BAKTERI *Salmonella typhi***

Persson, T., Hansen, T. H., Rasmussen, T. B., Skindersø, M. E., Givskov, M., & Nielsen, J. 2005. Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Organic & biomolecular chemistry*, 3(2), 253-262.

Pertanian, P. D. D. I. (2008). Departemen Pertanian. *Republik Indonesia*.

Pratiwi, E. 2010. Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi dan Reperkolasi dalam Ekstraksi Senyawa Aktif Andrographolide dari Tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees).

Rahmawati, R., 2014. *Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sisik naga (Drymoglossum piloselloides (L.) Presl) dan binahong (Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) terhadap bakteri Streptococcus mutans* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).

Roeselers, G., Van Loosdrecht, M. C. M., & Muyzer, G. 2007. Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development. *Microbial Ecology*, 54(3), 578-585.

Sabir, A., 2005. Aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona* sp terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro)(In vitro antibacterial activity of flavonoids *Trigona* sp propolis against *Streptococcus mutans*). *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 38(3), pp.135-141.

Salima, J., 2015. ANTIBACTERIAL ACTIVITY of GARLIC (*Allium sativum* L.). *Jurnal Majority*, 4(2).

Santoso, H.B. 2000. Bawang Putih. Edisi ke-12. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Senjaya, Y. A., & Surakusumah, W. 2008. POTENSI EKSTRAK DAUN PINUS (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) SEBAGAI BIOHERBISIDA PENGHAMBAT PERKECAMBAHAN *Echinochloa colonum* L. DAN *Amaranthus viridis*. (Potencies of Pine leaf Extract (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) as Bioherbicides for Germination Inhibitor of *Echinochloa colonum* L. and *Amaranthus viridis*). *Jurnal Perennial*, 4(1), 1-5.

Senadheera, D., & Cvitkovitch, D. G. 2008. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets* (pp. 178-188). Springer New York.

Setyawan, Febby Hadi. 2016. Teknik Identifikasi Bakteri pada Ikan Konsumsi Air Tawar dengan Metode Automatic Identification System menggunakan Vitek 2 Compact di Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL) Serang Banten. Malang.

Singh, V.K. and Singh, D.K. 2008. *Pharmacological effect of Garlic (Allium sativum L.)*. *Annu Rev Biomed Sci*. 10: 6-26.

Sholikhah, E. H. 2009. Efektivitas Campuran Meniran *Phyllanthus niruri* dan Bawang Putih *Allium sativum* dalam Pakan untuk Pengendalian Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele *Dumbo Clarias* sp.

Susanto, L.R.D., Nuryanti, A. and Wahyudi, I.A., 2012. Efek Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum* L.) Sebagai Agen Penghambat Pembentukan Biofilm *Streptococcus Mutans*. *Insisiva Dental Journal*, 2(1).

- Syamsuhidayat, S.S. dan Hutapea J.R. 1991. Invebtaris Tanaman Obat Indonesia. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Tahmourespour, A., Kermanshahi, R. K., Salehi, R., & Pero, N. G. 2010. Biofilm formation potential of oral streptococci in related to some carbohydrate substrates. *African Journal of Microbiology Research*, 4(11), 1051-1056.
- Yuliandari, R. 2015. Uji Aktivitas Antibiofilm Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) Terhadap Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* Secara In Vitro.
- Tarigan, Rasinta. 1990. *Karies Gigi*. Jakarta : Penerbit EGC
- Tille, P. 2015. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Wangi, R. P. L., Suswati, E., & Wisudanti, D. D. (2017). Aktivitas Ekstrak Metanol Bawang Putih (*Allium sativum*) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* (The Activity of Methanolic Extract of Garlic (*Allium sativum*) in Inhibiting Growth of Biofilm in *Pseudomonas aeruginosa*). *Pustaka Kesehatan*, 5(3), 537-543.
- Wiley, J. M., Sherwood, L., & Woolverton, C. J. 2008. *Prescott, Harley, and Klein's microbiology*. New York: McGraw-Hill Higher Education.
- Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Headley, J. V., Robarts, R. D., & Caldwell, D. E. 1994. Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants. *Microbial ecology*, 27(3), 279-291.
- Wu, X., Santos, R. R., & Fink-Gremmels, J. 2015. Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of *Staphylococcus epidermidis*. *Food science & nutrition*, 3(2), 158-168.
- Yuliandari, R. 2015. Uji Aktivitas Antibiofilm Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) Terhadap Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* Secara In Vitro.
- Zhai H, Pan J, Pang E, Bai B. 2014. Lavage with Allicin in Combination with Vancomycin Inhibit Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis* in a Rabbit Model of Prosthetic Joint Infection. *PLOS ONE*; 9(7):1-5.
- Zhang, X. 1999. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants: *Bulbus Allii Sativii*. Geneva: World Health Organization.