

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Pepaya

1. Sistematika tanaman pepaya

Kedudukan tanaman pepaya dalam taksonomi menurut Steenis (2002) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Sub divisio : Angiospermae
Kelas : Dicotylidoneae
Ordo : Caricales
Famili : Caricaceae
Genus : *Carica*
Spesies : *Carica papaya* L.

2. Nama lain

Nama lain tanaman pepaya adalah gedang (Sunda), kates (Jawa), punti kayu (Sumatra), pisang malaka (Kalimantan), uti jawa (Sulawesi), papaw tree, papaya, papayer, melonenbaum, dan fan mu gua (Muhlisah 2001).

3. Morfologi tanaman

Tanaman pepaya merupakan tanaman semak berbentuk pohon dengan batang lurus, di bagian atas bercabang, batang bagian dalam serupa spons dan berongga, di luar batang terdapat tanda bekas daun yang banyak, tinggi 2,5 - 10 meter. Daun menjari, ujung runcing dan pangkal berbentuk jantung, garis tengah 25-75 cm. Bunga berwarna putih kekuningan, bakal buah beruang satu, kepala putik 5. Buah berdaging, biji banyak, di dalamnya berduri tempel (Steenis 2002).

4. Ekologi dan penyebaran

Pepaya (*Carica papaya* L.) adalah tanaman yang berasal dari Amerika Tropis. Pusat penyebaran tanaman berada dibagian selatan Meksiko dan Nikaragua. Pelayar-pelayar bangsa Portugis pada abad ke 16 diduga turut menyebarkan tanaman pepaya ke berbagai benua dan negara, termasuk ke benua

Asia. Penyebaran tanaman pepaya dimulai dari India ke berbagai negara tropis lainnya, termasuk Indonesia dan pulau-pulau di Lautan Pasifik pada abad ke 17 (Kalie 1994).

5. Kandungan kimia

Penelitian yang telah dilakukan oleh Ekajayanti *et al.*, (2016) dan Livia *et al.* (2016) menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* L.) adalah golongan flavonoid, alkaloid, tanin, dan steroid. Ekstrak daun pepaya juga memiliki beberapa enzim yang bekerja sebagai antibiofilm yaitu enzim papain, enzim khimopapain, dan enzim lisozim.

5.1 Flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon. Flavonoid kebanyakan terdapat pada bagian biji, kulit buah, dan bunga (Robinson 1995). Flavonoid terdapat dalam tumbuhan sebagai campuran dan jarang sekali dijumpai hanya flavonoid tunggal dalam jaringan tumbuhan (Harborne 1987). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibiofilm adalah mampu menghambat ekspresi gen *icaA* dan *icaD* yang merupakan salah satu regulator pembentukan biofilm (Lee *et al.*, 2013). Gen *icaA* dan *icaD* dapat mensintesis *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA) yang mempunyai peran penting dalam pembentukan biofilm (Rohde *et al.*, 2010). Menurut penelitian Vikram *et al.*, (2010) flavonoid dapat menghambat ekspresi gen *lsrACDBF*, *csgA*, *csgB* yang merupakan regulator pembentukan *fimbria* pada biofilm *E. coli*, sehingga terganggunya metabolisme di dalam matriks ekstraselular akan mengakibatkan terhambatnya transport nutrisi (Lee *et al.*, 2011).

5.2 Alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa siklik yang mengandung nitrogen. Alkaloid bermanfaat dalam hal pengobatan karena memiliki efek fisiologis yang kuat dan selektif (Marek *et al.*, 2007). Alkaloid memiliki efek fisiologis kuat terhadap suatu asam kemudian membentuk garam alkaloid yang lebih larut (Harborne 1987). Alkaloid memiliki mekanisme penghambatan pembentukan biofilm dengan cara menghambat aktivitas quorumsensing atau komunikasi antar sel (Park *et al.*, 2008).

5.3 Tanin. Tanin merupakan senyawa polifenol yang membentuk kompleks dengan protein membentuk kopolimer tidak larut air. Tanin terdapat pada daun dan buah yang belum matang, merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk ke dalam golongan flavonoid, mempunyai rasa sepat, dan mampu menyamak kulit (Robinson 1995). Menurut penelitian Cobrado *et al.*, (2012) secara signifikan menunjukkan bahwa senyawa tanin dapat mereduksi aktivitas metabolisme biofilm. Senyawa tanin bersifat toksik bagi membran mikroba karena tanin dapat membentuk kompleks dengan ion logam yang dapat menyebabkan kerusakan membran sel mikroba (Akiyama *et al.*, 2001).

5.4 Steroid. Steroid merupakan senyawa yang mengandung tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Mempunyai senyawa fitosterol yang terdapat hampir di setiap tumbuhan yaitu sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Robinson 1995). Mekanisme kerja steroid sebagai zat antibiofilm adalah dengan merusak membran sel. Steroid mampu bereaksi dengan porin (protein transmembran) yang berada pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer kuat dan merusak porin, mengurangi permeabilitas membran sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi yang mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat kemudian mati.

5.5 Enzim papain, khimopapain, dan lisozim. Getah daun pepaya mengandung tiga jenis enzim. Enzim papain merupakan enzim proteolitik yang dapat mendegradasi protein dan matriks ekstraselular pada biofilm. Enzim khimopapain berfungsi mengkatalisis reaksi hidrolisis protein dan polipeptida, serta enzim lisozim berfungsi memecah dinding sel bakteri (Moussaoui *et al.*, 2001).

6. Kegunaan daun pepaya

Penelitian terhadap daun pepaya (*Carica papaya* L.) menunjukkan adanya aktivitas antioksidan, antidiabetes, antihipertensi, antibakteri, antijamur, dan analgetik. Selain itu daun pepaya juga bermanfaat menambah nafsu makan, melancarkan ASI, pertumbuhan rambut, serta meningkatkan kekebalan tubuh (Pratiwi *et al.*, 2018).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun kecuali dinyatakan lain dan berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibagi menjadi 3 yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia mineral. Simplisia nabati adalah simplisia berupa tanaman utuh, bagian atau eksudat tanaman dengan tingkat kehalusan tertentu. Simplisia hewani adalah simplisia berupa hewan utuh, atau zat yang dihasilkan oleh hewan yang belum diolah. Simplisia mineral adalah simplisia belum berupa zat kimia murni (Depkes RI 1985).

2. Pengeringan simplisia

Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air dalam suatu bahan sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi mikroba. Pengeringan simplisia dilakukan dengan menggunakan alat pengering. Faktor-faktor saat pengeringan yang perlu diperhatikan adalah suhu pengeringan, kelembaban udara, aliran udara, waktu pengeringan dan luas permukaan bahan (Gunawan & Mulyani 2004).

3. Penyarian simplisia

Penyarian adalah penarikan zat yang larut dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Simplisia yang disari mengandung zat aktif yang dapat larut dan tidak dapat larut. Faktor yang mempengaruhi kecepatan penyarian adalah kecepatan difusi zat yang larut melalui lapisan-lapisan batas antara cairan penyari dengan bahan yang mengandung zat tersebut. Proses penyarian meliputi pembuatan serbuk, penyarian, dan pemekatan (Depkes RI 1986).

C. Ekstraksi

Ekstraksi adalah peristiwa penarikan zat aktif di dalam sel oleh cairan penyari sehingga zat aktif keluar sel dan larut dalam cairan penyari. Penyarian akan semakin baik apabila kontak antara bahan baku dan cairan penyari semakin luas (Depkes RI 1986). Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair yang diambil sari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok diluar pengaruh cahaya matahari langsung (Depkes RI 1979).

1. Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan pelarut yang sesuai dan dilakukan beberapa kali pengocokan pada temperatur kamar (Depkes RI 2000). Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat akan terlarut karena ada perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan terpekat akan didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Maserasi merupakan proses paling tepat untuk menyari bahan halus yang mudah untuk direndam dengan pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut (Ansel 1989).

2. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu cara pemisahan golongan utama kandungan yang satu dari golongan yang lain berdasarkan perbedaan kepolaran suatu senyawa. Pertama ekstrak kental difraksinasi berturut-turut dengan larutan penyari yang berbeda-beda polaritasnya. Masing-masing pelarut secara selektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula-mula disari dengan pelarut non polar lalu disari dengan pelarut semi polar kemudian dilanjutkan disari dengan pelarut polar (Harborne 1987).

Fraksinasi digunakan ekstraksi cair-cair karena bersifat sederhana, bersih, cepat, dan mudah. Ekstraksi cair-cair adalah suatu teknik bila suatu larutan dibuat bersentuhan dengan suatu pelarut kedua yang pada hakekatnya tak tercampurkan dengan pelarut pertama dan menimbulkan perpindahan satu atau lebih zat terlarut ke dalam pelarut yang kedua. Pemisahan dilakukan dengan cara digojok dalam corong pisah selama beberapa menit. Faktor yang mempengaruhi kesempurnaan ekstraksi adalah jenis pelarut dimana pelarut polar akan melarutkan lebih baik zat polar dan pelarut non polar juga akan melarutkan lebih baik zat yang bersifat non polar. Zat aktif yang digunakan pada umumnya bersifat asam lemah dan basa lemah dimana kelarutannya dipengaruhi oleh pH larutannya (Basset *et al.*, 1994).

3. Penyari

Penyari adalah pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan kepolaran senyawa. Penyari yang baik untuk ekstraksi adalah toksisitasnya rendah, mudah diuapkan pada suhu rendah, ekstraknya menunjukkan absorpsi yang cepat di dalam tubuh, serta tidak menyebabkan kerusakan ekstrak. Faktor yang mempengaruhi pemilihan penyari yaitu jumlah senyawa yang akan diekstraksi, kecepatan penyarian, keberagaman senyawa yang diekstraksi, dan toksisitas penyari (Tiwari *et al.*, 2011).

3.1 Etanol. Etanol merupakan salah satu jenis penyari yang umum digunakan. Etanol lebih efisien dalam menembus dinding sel dan membran sel sehingga dapat menyari komponen intraseluler dari bahan (Wang 2010). Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, flavonoid, antrakuinon, steroid dan klorofil. Lemak, tanin, dan saponin hanya sedikit larut. Etanol dipertimbangkan sebagai larutan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman kulit tidak dapat tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada skala perbandingan, dan panas yang diperlukan lebih sedikit (Depkes RI 2000). Etanol umumnya menghasilkan suatu bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotornya hanya dalam skala kecil ikut dalam cairan pengekstraksi (Voigt 1994).

3.2 *n*-Heksan. *n*-Heksan adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih terdiri dari suatu campuran rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, transparan, mudah menguap, mudah terbakar, berbau khas, tidak dapat larut air, serta dapat larut dengan alkohol, benzen, kloroform, dan eter (Tiwari *et al.*, 2011). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti lemak, asam lemak tinggi, steroid, terpenoid, triterpenoid, dan karotenoid (Depkes RI 1987).

3.3 Etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat jernih, tidak berwarna, berbau khas, mudah terbakar, mudah menguap, larut dalam 15 bagian air, serta dapat bercampur dalam eter, etanol, dan kloroform (Depkes RI 1986). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut etil asetat yaitu senyawa yang bersifat semi polar seperti alkaloid, flavonoid, dan polifenol (Harborne 1987).

3.4 Air. Air merupakan pelarut yang sangat polar digunakan untuk menyari senyawa organik polar sehingga cocok untuk pelarut polar dalam proses fraksinasi. Air dapat melarutkan garam alkaloid, tanin, saponin, gula, gom, pati, protein, enzim, dan asam organik. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan karena selain zat aktif yang tersari zat lain yang tidak diperlukan juga ikut tersari sehingga mengganggu proses penyarian. Air dipertimbangkan sebagai pelarut sebab murah, mudah diperoleh, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan bersifat alamiah (Depkes RI 1986). Pemakaian tradisional mengutamakan air sebagai pelarut untuk mengekstraksi, tetapi menurut beberapa penemuan membuktikan bahwa pelarut organik lebih konsisten dalam memberikan aktivitas antimikroba dibandingkan dengan air (Tiwari *et al.*, 2011).

D. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah metode pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan molekul pada larutan. Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan fisiko-kimia. Lapisan yang memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa plat gelas. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan berupa bercak. Setelah plat ditaruh di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Selanjutnya senyawa tidak berwarna harus ditampakkan dengan sinar UV 254 atau 366 nm, jika cara tersebut tidak dapat dideteksi, maka dilakukan deteksi dengan pereaksi kimia (Stahl 1985).

Identifikasi suatu senyawa biasa dilakukan dengan membandingkan senyawa standarnya. Pengamatan berdasarkan kedudukan dari noda terhadap batas pelarut dikenal sebagai harga Rf (*Retention factor*). Nilai Rf antara 0,00 sampai 1,00. Faktor-faktor yang mempengaruhi harga Rf yaitu struktur kimia senyawa yang dipisahkan, sifat penyerap, tebal dan kerataan penyerapan, pelarut dan derajat kemurnian fase gerak, serta derajat kejenuhan dari uap dalam pengembang (Sastrohamidjojo 1991).

E. *Streptococcus mutans* ATCC 25175

1. Sistematika *Streptococcus mutans*

Sistematika bakteri *Streptococcus mutans* menurut Cappuccino dan Sherman (1983) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Monera
Divisi	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacilalles
Famili	: Streptococcaceae
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Spesies	: <i>Streptococcus mutans</i>

2. Morfologi *S. mutans*

S. mutans dijumpai dalam dua bentuk yaitu bulat dan berpasangan menyerupai rantai. *S. mutans* cenderung berbentuk bulat dengan formasi rantai panjang apabila ditanam pada medium yang diperkaya seperti pada *Brain Heart Infusion Broth (BHI-B)*, sedangkan bila ditanam di media agar memperlihatkan rantai pendek tidak beraturan (Michalek dan McGee 2005).

S. mutans merupakan bakteri Gram positif, bersifat non motil, dan bakteri anaerob fakultatif. Bakteri ini tersebar di alam dan beberapa diantaranya terdapat dalam tubuh manusia (Brooks *et al.*, 2007). *S. mutans* dapat berubah menjadi patogen ketika lingkungan menguntungkan dan terjadi peningkatan populasi (Kidd dan Bechal 2008). *S. mutans* tumbuh optimal pada suhu 18⁰ - 40⁰C dan banyak ditemukan pada rongga gigi manusia (Nugraha 2008).

3. Habitat *S. mutans*

Habitat utama *S. mutans* adalah pada permukaan gigi. *S. mutans* tidak dapat tumbuh secara menyeluruh pada permukaan gigi, namun sering tumbuh pada area tertentu di permukaan gigi. Koloni *S. mutans* biasa ditemukan dalam area proksimal gigi, gingiva, atau pada lesi karies gigi. Jumlah populasi *S. mutans* dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti sukrosa, aplikasi fluor, penggunaan antibiotik, obat kumur dengan antiseptik dan oral hygiene (Nugraha 2008).

Media selektif untuk menumbuhkan *S. mutans* adalah agar Mitis Salivarius. Pertumbuhan *S. mutans* pada agar Mitis Salivarius memperlihatkan bentuk koloni halus berdiameter 0,5 – 1,5 mm, cembung, berwarna biru tua, pinggiran koloni kasar, serta membentuk genangan di sekitarnya (Michalek dan Mc Ghee 2005). Media lain yang bisa menumbuhkan *S. mutans* adalah *Brain Heart Infusion Broth (BHI-B)*, *Trypton Yeast Cystein (TYC)*, dan agar darah (Sukanto *et al.*, 2002).

4. Patogenitas *S. mutans*

S. mutans merupakan agen utama penyebab karies gigi, namun tanpa adanya faktor lain seperti sukrosa, bakteri ini tidak dapat menyebabkan karies. Enzim yang dihasilkan *S. mutans* adalah glikosiltransferase dan fruktosil transferase. Enzim-enzim ini bersifat spesifik untuk substrat sukrosa pada sintesa glukosa dan fruktan. Enzim glikosiltransferase menggunakan sukrosa untuk mensintesa molekul glukosa dengan berat molekul tinggi yang terdiri dari ikatan glukosa alfa (1 - 6) dan alfa (1 - 3) (Michalek dan McGee 2005). Ikatan glukosa alfa (1 - 3) sangat pekat seperti lumpur, lengket dan tidak larut dalam air. Kelarutan ikatan glukosa alfa (1 - 3) dalam air berpengaruh terhadap pembentukan koloni *S. mutans* pada permukaan gigi (Roeslan dan Melanie 2005). Ikatan glukosa alfa (1- 3) berfungsi membantu perlekatan koloni bakteri satu sama lain pada enamel yang erat kaitannya dengan pembentukan plak dan terjadinya karies gigi (Samarayanake 2002).

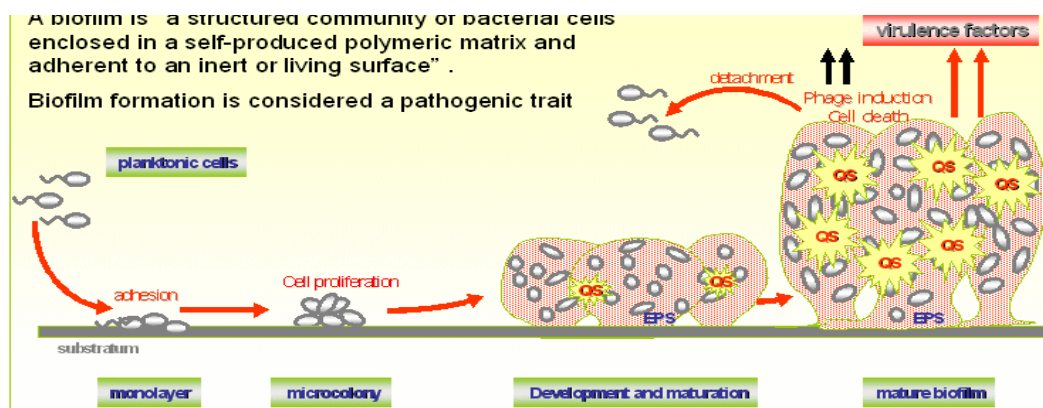
Karies gigi merupakan salah satu kerusakan gigi yang dimulai dari permukaan gigi dan berkembang ke arah dalam. Permukaan email mula-mula mengalami demineralisasi akibat pengaruh asam hasil peragian bakteri. Bakteri rongga mulut dapat mengubah karbohidrat menjadi asam yang kemudian melarutkan kalsiumfosfat pada email sehingga menghasilkan lesi karies. Kemudian dekomposisi dentin dan sementum oleh bakteri. Langkah pertama dalam karies adalah pembentukan plak pada permukaan email yang keras dan halus. Plak ini terdiri dari endapan gelatin dari glukosa yang mempunyai berat molekul besar, bakteri penghasil asam melekat pada email polimer karbohidrat (glukan) yang dihasilkan *S. Mutans* yang dapat bekerja sama dengan *Actinomyces* (Mars 1999).

F. Biofilm

Biofilm merupakan komunitas bakteri yang saling berkomunikasi dan melekat pada permukaan inert atau hidup. Mikroorganisme dalam biofilm terdapat di dalam matriks polimer yang diproduksi sendiri dengan eksopolisakarida sebagai bahan utamanya. Matriks biofilm tersusun atas polisakarida, protein, dan DNA yang berasal dari mikroba (Paraje 2011). Biofilm terbentuk pada berbagai macam permukaan seperti jaringan hidup, kateter, dan pipa air. Contoh biofilm adalah karies gigi, infeksi telinga, dan infeksi perangkat medis (Donlan 2002).

1. Pembentukan biofilm

Pembentukan biofilm umumnya terdiri atas lima tahapan yaitu tahap pertama adalah perlekatan bakteri planktonik ke permukaan suatu benda yang dapat diinisiasi dari elektrolit dan protein. Tahap ini, peranan faktor virulensi bakteri seperti flagel dan adhesin memegang peranan penting. Tahap kedua adalah perlekatan yang sifatnya menetap atau irreversible, pada tahap ini mikroba melekat dengan bantuan eksopolisakarida yang akan mengubah perlekatan menjadi *irreversible*. Tahap ketiga adalah pembentukan lapisan kompleks biomolekul dan matriks *extracellular polymeric substances* (EPS) untuk membentuk mikrokoloni. Tahap keempat adalah pematangan biofilm dan tahap kelima terjadi pelepasan bakteri biofilm lagi untuk kembali membentuk lapisan biofilm lainnya (Wel Q dan Ma LZ 2013). Pembentukan biofilm tergantung konsentrasi nutrisi yang tersedia dan diatur oleh suatu zat kimia kompleks yang dikeluarkan oleh sel sebagai komunikasi antar sel (Donlan 2002).



Gambar 1. Mekanisme pembentukan biofilm (Donlan 2002).

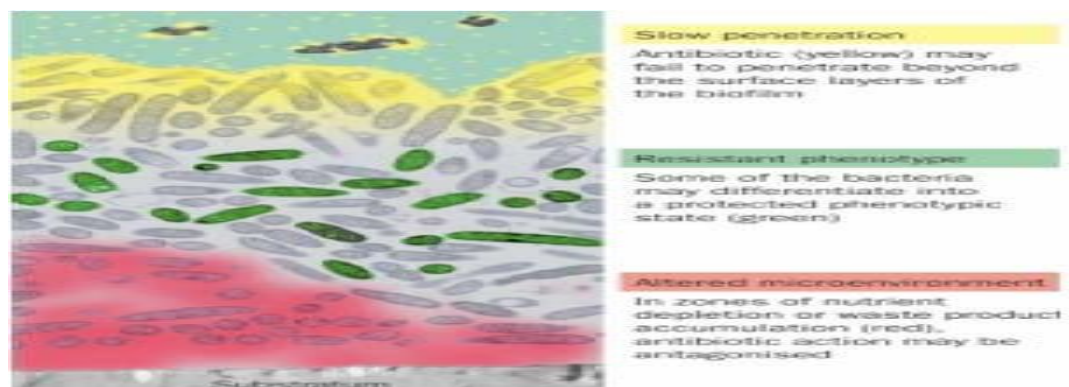
2. Quorum sensing

Faktor lain yang memicu pembentukan biofilm selain keterbatasan nutrisi adalah quorum sensing, yaitu mekanisme untuk memastikan jumlah sel mencukupi sebelum suatu spesies melakukan respon biologi khusus. Setiap sel akan menghasilkan molekul sinyal untuk berkomunikasi dengan sel yang lain, bila jumlah sel mikroba tersebut cukup banyak, maka molekul sinyal tersebut juga cukup banyak untuk memicu pembentukan biofilm oleh keseluruhan bakteri tersebut. Molekul-molekul sinyal tersebut berbeda untuk tiap jenis mikroba dan memiliki peranannya masing-masing.

Streptococcus gordonii memiliki salah satu gen yang berperan dalam sel-sel *signaling* yaitu ComD dimana mutannya tidak dapat membentuk biofilm. Sel-sel *signaling* juga berperan dalam perlekatan dan lepasnya sel-sel biofilm. Aktivitas gen yang mengkode ekspresi fimbriae (*fimA*) pada bakteri *dental plaque* yaitu *Porphyromonas gingivalis*. Bakteri ini tidak melekat pada biofilm *Streptococcus cristalis* karena bakteri ini menghasilkan substansi yang mempengaruhi ekspresi *fimA* sehingga mencegah perlekatan *P. gingivalis* (Davies *et al.*, 2009).

3. Mekanisme resistensi biofilm terhadap antibiotik

Aspek terpenting dari pembentukan biofilm bakteri adalah peningkatan resistensi mikroba terhadap antibiotik. Sifat struktural dan karakteristik sel biofilm menghasilkan resistensi terhadap agen antimikroba berkaitan dengan mekanisme perlindungan dan pertahanan dari kondisi lingkungan yang buruk.



Gambar 2. Mekanisme resistensi biofilm terhadap antibiotika

Pengaruh beberapa faktor intrinsik biofilm yang berbeda mempengaruhi resistensi antibiotik telah diidentifikasi. Berikut ini adalah mekanisme pertahanan yang menyebabkan resistensi :

Pertama, matrik biofilm dapat bertindak sebagai fisik untuk mencegah antibiotik mencapai target. Antibiotik mampu menembus struktur campuran eksopolipeptida, DNA, dan protein untuk mencapai target tetapi tidak mampu mencapai konsentrasi efektif disemua bagian. Kedua, pembentukan lingkungan mikro dalam biofilm. Menipisnya jumlah nutrisi dan oksigen di dalam biofilm dapat menyebabkan aktivitas metabolisme diubah dan menyebabkan perlambatan pertumbuhan bakteri. Ketiga, diferensiasi menjadi sel persister. Persister sel dianggap tidak tumbuh atau tumbuh lambat, dan juga memiliki kerentanan yang sangat berkurang terhadap antibiotik. Menurut teori persister, rute dari sub populasi kecil bakteri dalam biofilm berdiferensiasi menjadi sel aktif, mampu bertahan terhadap pengobatan antibiotik yang ekstrim karena perubahan genetik yang stabil. Keempat, peningkatan produksi tekanan oksidatif. Tekanan oksidatif yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara jumlah oksidan, seperti radikal bebas, peroksida, dan oksida nitrat dengan antioksidannya. Ketidakseimbangan prooksidan-antioksidan menyebabkan kelebihan produksi senyawa oksigen reaktif (SOR), kerusakan pada komponen seluler, termasuk DNA, protein, dan lipid. Bakteri akan membentuk senyawa antioksidan sebagai respon fisiologis terhadap SOR, sehingga bakteri beradaptasi terhadap tekanan oksidatif yang menyebabkan perubahan metabolik yang cepat. Enzim yang terlibat dalam sistem pertahanan antioksidan dan detoksifikasi SOR adalah superoksida dismutase (SOD) dan katalase. Kelima, aksi antagonis antibiotik dan mekanisme degradasi antibiotik di beberapa bagian biofilm (Paraje 2011).

4. Parameter penghambatan biofilm.

Penghambatan biofilm biasanya menggunakan pendekatan uji, yaitu uji kristal violet. Uji kristal violet digunakan untuk menentukan biomassa biofilm termasuk sel mati maupun sel hidup (Chaine *et al.*, 2011). Ukuran kekuatan penghambatan pembentukan biofilm suatu bahan baik pada uji kristal violet dapat menggunakan parameter IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*). IC_{50} menyatakan

kadar terendah suatu bahan atau sampel yang dapat memberikan hambatan pembentukan biofilm sebesar 50% persentase penghambatan biofilm dihitung dari data OD (*optical density*) berdasarkan persamaan $(1 - (xOD_t - xOD_{mc} / xOD_{vc})) \times 100$ (Pratiwi *et al.*, 2015).

5. Faktor perlekatan biofilm mikroba.

Pembentukan biofilm dimulai ketika bakteri melekat pada permukaan melalui molekul organik kecil. Tingkat perlekatan sel mikroba diatur oleh faktor-faktor seperti sifat permukaan, kondisi lapisan permukaan, karakteristik dan hidrodinamika dari media cair, berbagai karakteristik permukaan sel mikroba, regulasi gen, dan kuorum sensing. Tingkat dan kekuatan perlekatan sel mikroba dipengaruhi oleh sifat permukaan sel seperti produksi zat pilomer ekstraseluler (EPS), hidrofobitas permukaan sel mikroba, kehadiran fimbriae, dan flagella. Hidrofobik dari permukaan sel berperan penting dalam adhesi karena interaksi hidrofobik cenderung meningkat dengan meningkatnya sifat non polar dari permukaan yang terlibat. Bukti menunjukkan bahwa flagela berperan penting dalam tahap awal perlekatan bakteri dengan mengatasi kekuatan substrat dan protein permukaan. EPS dan lipopolisakarida berperan penting dalam perlekatan untuk bahan hidrofilik, oleh karena itu sel yang motif melekatkan lebih banyak dan sel yang melawan arus lebih cepat daripada strain non motil (Mahami 2011).

6. Komposisi dan struktur biofilm.

Komponen utama biofilm terdiri dari sel-sel mikroorganisme (15%) dan bahan matrik campuran protein, asam nukleat, karbohidrat, dan zat lainnya (85%). Eksopolisakarida yang dihasilkan berbeda-beda komposisi dan sifat kimiawinya. Beberapa eksopolisakarida merupakan makromolekul yang bersifat netral dan sebagian besar bermuatan karena adanya asam uronat, asam D-galakturonat, dan asam D-manuronat (Davey 2000). Ikatan eksopolisakarida yang ada pada biofilm bersifat kaku. Jumlah eksopolisakarida yang dihasilkan oleh organisme berbeda-beda. Jumlah eksopolisakarida akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia biofilm tersebut dan eksopolisakarida yang dihasilkan tergantung dari kandungan nutrisi dan media pertumbuhan (Donlan 2002). Biofilm merupakan polimorfik dan dapat menyesuaikan struktur terhadap perubahan jumlah nutrisi, yang telah

ditunjukkan oleh percobaan dengan konsentrasi glukosa yang berbeda. Ketika konsentrasi glukosa tinggi, mikrokoloni tumbuh dengan cepat dan akibatnya ketebalan biofilm meningkat secara signifikan. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa perubahan struktur biofilm tergantung pada aliran. Aliran laminar mikrokoloni bakteri menjadi bulat, sedangkan dalam aliran turbulen mereka berbentuk panjang ke arah hilir (Stoodley *et al.*, 1998).

7. Pengendalian biofilm

Biofilm yang terdiri dari bakteri patogen dapat menimbulkan masalah yang serius bagi kesehatan manusia. Hal ini menyebabkan perlunya suatu cara atau pengendalian khusus pada biofilm secara kimia, fisika, dan biologi.

7.1 Secara kimia. Pengendalian biofilm biasanya dilakukan seperti halnya proses sanitasi dengan cara penambahan suatu zat kimia. Sanitasi kimia dilakukan dengan menggunakan disinfektan. Tujuan penggunaan disinfektan ialah untuk mereduksi jumlah mikroorganisme patogen. Teknik perlakuan deaktivasi mikroba dapat dilakukan dengan menggunakan enzim berbasis deterjen juga dikenal dengan *bio-cleaners* (Simoes *et al.*, 2010).

7.2 Secara fisika. Pengendalian biofilm selain menggunakan bahan kimia dapat juga dilakukan dengan metode fisika yaitu memanfaatkan suhu yang tinggi atau pemanasan. Sanitasi dengan menggunakan air panas lebih menguntungkan karena air panas mudah tersedia dan tidak beracun. Peralatan seperti pisau dapat direndam dalam air yang dipanaskan hingga suhu 80⁰C (Yunus 2000).

Tinggi rendahnya suhu mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Bakteri dapat tumbuh dalam rentang suhu yang pendek yang ditentukan oleh sensitifitas sistem enzimnya terhadap panas. Aktivitas panas sering dijadikan sebagai sanitasi suatu peralatan kesehatan dan peralatan proses penanganan makanan. Hasil penelitian (Trisnawati 2010) jumlah bakteri sebelum perlakuan sanitiser air panas berkisar 120-280 CFU/cm², sedangkan sesudah perlakuan hasil pemeriksaan angka total bakteri berkisar antara 80-100 CFU/cm². Hasil analisis menunjukkan bahwa proses sanitasi memberikan pengaruh terhadap penurunan angka total bakteri.

7.3 Secara biologi. Teknik perlakuan deaktivasi mikroba secara biologi dapat dilakukan dengan pengendalian fage dan interaksi mikrobiologis atau molekul metabolit (Simoes *et al.*, 2010). Pengendalian biofilm juga dapat dilakukan dengan interaksi interspesies jamak atau produksi suatu metabolit sederhana. Banyak bakteri yang mampu mensintesis dan mensekresikan biosurfaktan dengan sifat anti lekat yang kuat.

G. Media

1. Pengertian

Media adalah bahan yang terdiri dari zat-zat kimia organik dan atau anorganik yang setelah melalui proses pengolahan tertentu dapat digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakan mikroba. Media yang digunakan dalam mikrobiologi harus memiliki syarat-syarat yaitu mengandung unsur-unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba, mempunyai tekanan osmose, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba, steril, dan tidak bersifat toksik (Suriawiria 1986).

2. Macam-macam media

Secara umum media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan dan mengembangbiakan mikroba dapat dibedakan menjadi dua macam yaitu menurut sifat dan konsistensinya.

2.1 Media menurut sifatnya. Menurut sifatnya media dapat dibedakan menjadi medium umum, medium pengaya, medium selektif, medium diferensial, dan medium penguji. Pertama, media umum digunakan untuk menumbuhkan satu atau lebih kelompok mikroba secara umum, contohnya Nutrient Agar. Kedua, media pengaya digunakan untuk memberi kesempatan mikroba untuk tumbuh dan berkembang lebih cepat dari yang lainnya dalam satu sampel. Ketiga, media selektif adalah media yang hanya dapat ditumbuhi oleh satu atau lebih mikroorganisme tertentu, tetapi akan menghambat atau mematikan jenis lainnya. Keempat, media diferensial digunakan untuk menumbuhkan mikroba tertentu serta penentuan sifat-sifatnya. Kelima, media penguji digunakan untuk penguji senyawa atau benda-benda tertentu dengan bantuan mikroba (Radji 2011).

2.2 Media menurut konsistensinya. Menurut konsistensinya media dapat dibedakan menjadi medium cair, medium padat dan medium setengah padat. Pertama, medium cair seperti kaldu glukosa dapat digunakan untuk berbagai keperluan seperti perbiakan organisme dalam jumlah besar, penelaahan fermentasi dan berbagai macam uji. Kedua, medium padat, digunakan untuk mengamati penampilan atau morfologi koloni dan mengisolasi biakan murni. Ketiga, medium setengah padat, digunakan untuk menguji ada tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi (Hadioetomo 1985).

H. Sterilisasi

Bahan yang digunakan dalam bidang mikrobiologi harus steril, artinya bahan atau peralatan tersebut bebas dari mikroba. Tindakan sterilisasi yang dapat dilakukan meliputi : pertama, sterilisasi secara fisik yaitu dengan pemanasan, penggunaan sinar UV, dan radiasi. Kedua, sterilisasi secara kimia yaitu memakai bahan kimia misal dengan penggunaan disinfektan, larutan alkohol, dan larutan formalin. Ketiga, sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan dengan pori-pori halus sehingga dapat menahan bakteri. Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 170°-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanas api langsung, sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria 1986).

I. Landasan Teori

Karies merupakan penyakit jaringan keras gigi yang disebabkan oleh aktivitas jasad renik dalam karbohidrat yang dapat diragikan. Tandanya adalah demineralisasi jaringan keras gigi kemudian dapat menyebabkan nyeri. Bakteri yang menyebabkan karies gigi adalah *S. mutans*. Bakteri tersebut banyak ditemukan di mulut dan merupakan penyebab utama karies gigi. Bakteri biasanya terakumulasi di permukaan gigi dan hidup dalam lapisan biofilm yang tersusun atas koloni bakteri, lapisan ekstraseluler, saluran cairan, dan sistem komunikasi.

Pembentukan biofilm pada gigi dapat dicegah dengan menyikat gigi secara rutin setiap hari maupun menggunakan agen terapi yang efektif. Beberapa obat seperti cetylpirinidium chloride, fluoride, klorheksidin, dan turunan fenol biasa digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dalam rongga mulut. Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman karena memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit daripada obat modern. Salah satu tanaman yang sering digunakan dalam pengobatan tradisional adalah daun pepaya. Pepaya adalah tanaman yang berasal dari Amerika Tropis. Penelitian yang telah dilakukan oleh Ekajayanti *et al.*, (2016) dan Livia *et al.* (2016) menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun pepaya adalah golongan flavonoid, alkaloid, tanin, dan steroid. Ekstrak daun pepaya juga memiliki beberapa enzim yang bekerja sebagai antibiofilm yaitu enzim papain, khimopapain, dan lisozim. Penelitian terhadap daun pepaya menunjukkan adanya aktivitas antioksidan, antidiabetes, antihipertensi, antibakteri, dan analgetik.

Penelitian terdahulu telah dilakukan uji aktivitas antibiofilm ekstrak daun pepaya terhadap *E. coli* yang menunjukkan bahwa aktivitas antibiofilm paling baik pada konsentrasi 75-100%^{v/v} (Livia *et al.*, 2016), sedangkan penelitian oleh Ekajayanti *et al.* (2016) menunjukkan bahwa ekstrak daun pepaya memiliki aktivitas antibiofilm terhadap *P. aeruginosa* pada konsentrasi 25%^{v/v}. Penelitian aktivitas antibiofilm ekstrak dan fraksi daun pepaya terhadap *S. mutans* belum pernah dilakukan, sehingga pada penelitian ini akan dilakukan uji antibiofilm dengan bakteri *S. mutans* ATCC 25175 terhadap ekstrak dan fraksi daun pepaya.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi dan fraksinasi. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan pelarut yang sesuai dan dilakukan beberapa kali pengocokan pada suhu kamar, sedangkan fraksinasi adalah proses ekstraksi komponen-komponen dalam suatu ekstrak menjadi fraksi-fraksi. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%. Pelarut etanol 96% digunakan karena lebih selektif, kapang dan kuman kulit tidak dapat tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, dan panas yang diperlukan lebih sedikit (Depkes RI 2000). Senyawa yang larut dalam pelarut *n*-heksan yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti lemak, asam lemak

tinggi, steroid, terpenoid, triterpenoid, dan karotenoid (Depkes RI 1987). Senyawa yang dapat larut dalam pelarut etil asetat yaitu senyawa yang bersifat semi polar seperti alkaloid, flavonoid, dan polifenol (Harborne 1987). Air dapat melarutkan garam alkaloid, tanin, saponin, gula, enzim, dan asam organik (Depkes RI 1986).

Penelitian oleh Muhammad (2011) ekstrak daun pepaya menunjukkan adanya aktivitas antibakteri secara *in vitro* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* sebesar 9,03 mm dan Ida (2016) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak daun pepaya mempunyai daya hambat terbaik terhadap bakteri *Salmonella typhi* sebesar 18,72 mm pada konsentrasi 100%. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diperoleh suatu kesimpulan bahwa fraksi etil asetat dari ekstrak daun pepaya mempunyai aktivitas paling efektif sebagai antibakteri.

Pengujian terhadap aktivitas penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dilakukan secara *in vitro* menggunakan *microtiterplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Penghambatan biofilm menggunakan uji kristal violet. Uji kristal violet digunakan untuk menentukan biomassa biofilm termasuk sel mati maupun sel hidup (Chaineb *et al.*, 2011). Ukuran kekuatan penghambatan pembentukan biofilm pada uji kristal violet dapat menggunakan parameter IC_{50} (*Inhibition Concentration 50%*). Nilai $IC_{50} < 50$ mg/ml sangat kuat, IC_{50} 50-100 mg/ml kuat, IC_{50} 100-150 mg/ml sedang, dan IC_{50} 150-200 mg/ml lemah dalam menghambat biofilm (Safa *et al.*, 2010).

J. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada disusun suatu hipotesis sebagai berikut :

Pertama, ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun pepaya (*Carica papaya* L.) mampu menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175.

Kedua, fraksi etil asetat daun pepaya paling efektif sebagai antibiofilm terhadap *S. mutans* ATCC 25175.

Ketiga, ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun pepaya sangat kuat dalam menghambat biofilm *S. mutans* ATCC 25175 ($IC_{50} < 50$ mg/ml).