

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Alamanda

1. Sistematika tanaman

Tanaman Alamanda (*A. cathartica* L.) dalam klasifikasi tumbuhannya sebagai berikut :

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Apocynales
Keluarga	: Apocynaceae
Marga	: Allamanda
Jenis	: <i>Allamanda cathartica</i> L. (Naiola 1986).



Gambar 1. Tanaman Alamanda (Sumber: Encyclopedia of Life 2019)

2. Nama lain

Allamanda cathartica adalah tanaman hias yang umum disebut sebagai bunga alamanda dan juga sering disebut sebagai bunga terompet emas, bunga lonceng kuning, atau bunga *buttercup* (Simoes AO *et al.* 2006). Alamanda (*A. cathartica* L.) memiliki nama daerah *Lame areuy* (Sunda) dan *bunga akar kuning* (Melayu).

3. Morfologi tanaman

Alamanda merupakan tanaman yang menyukai sinar matahari dan tumbuh di daerah tropis. Tanaman ini banyak ditemui di Indonesia, khususnya di Pulau Jawa dan Bali. Tanaman ini merupakan tanaman perdu dengan tinggi 4 sampai 5 m. batang berkayu, berbuku-buku, tiap buku terdapat 4 sampai 5 daun yang melingkar, dan bergetah. Daun alamanda merupakan daun tunggal, lonjong, tepi rata melipat ke bawah, ujung, dan pangkal meruncing. Bunga alamanda adalah bunga majemuk dengan bentuk tandan di ujung cabang, dan ketiak daun. Tangkai alamanda berbentuk silindris, pendek, dan hijau. Kelopak bunga alamanda berbentuk lanset, permukaan halus, dan hijau. Benang sari alamanda tertancap pada mahkota, mahkota berseling pada lekukan, tangkai putik silindris, kepala putik bercangap dua, dan mahkota bentuk terompet atau corong. Buah alamanda berbentuk kotak, bulat, diameter $\pm 1,5$ cm dengan biji berbentuk segitiga, masih muda hijau keputih-putihan setelah tua hitam dan alamanda memiliki akar tunggang berwarna putih kusam (Hidayat dan Rodame 2015).

4. Kandungan kimia

Daun alamanda (*A. cathartica* L.) mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin galat, steroid dan triterpenoid (Kusmiati *et al.* 2014).

1. Alkaloid. Alkaloid merupakan senyawa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam bentuk gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Menurut Jouvenaz *et al.* (1972) dan Karou *et al.* (2006), senyawa alkaloid dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Karou *et al.* (2006) mengatakan bahwa senyawa alkaloid dapat menyebabkan lisis sel dan perubahan morfologi bakteri.

2. Flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang terbanyak ditemukan di alam. Senyawa ini umumnya ditemukan pada tumbuhan yang berwarna merah, ungu, biru, atau kuning (Lenny 2006). Sebagian besar senyawa flavonoid di alam ditemukan dalam bentuk glikosid. Glikosida adalah kombinasi antara suatu gula dan suatu alkohol yang saling berikatan melalui ikatan glikosida. Gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida,

dimetilformamida, dan air (Lenny, 2006). Senyawa golongan flavonoid dari beberapa bahan alam dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri diduga mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel (Nishino *et al*, 1987).

3. Saponin. Saponin adalah suatu glikosida yang ada pada banyak macam tanaman. Saponin ada pada seluruh tanaman dengan konsentrasi tinggi pada bagian-bagian tertentu, dan dipengaruhi oleh varietas tanaman dan tahap pertumbuhan. Saponin diduga berperan sebagai senyawa antibakteri karena memiliki kemampuan untuk menghambat fungsi membran sel sehingga merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel rusak atau hancur. (Yuanita N K 2012).

4. Tanin. Tanin merupakan senyawa polifenol yang larut dalam air, gliserol, metanol, hidroalkoholik, dan propilena glikol, tetapi tidak dapat larut dalam benzena, kloroform, eter, petroleum eter, dan karbon disulfida (Harboune 1987). Tanin mempunyai rasa sepat dan juga bersifat antibakteri dan astringent atau menciutkan dinding usus yang rusak karena bakteri atau asam (Wienarno *et al* 1997). Mekanisme penghambatan tanin terhadap bakteri adalah dengan merusak membran sel, inaktivasi enzim-enzim esensial, dan destruksi fungsi material genetik (Brannen & Davidson 1993).

5. Steroid. Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri yaitu dengan merusak membran lipid, sehingga liposom mengalami kebocoran (Madduluri *et al*. 2013). Steroid juga diketahui dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid, karena sifatnya yang permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel terganggu yang mengakibatkan sel mengalami lisis dan rapuh (Ahmed 2007).

5. Khasiat

Daun alamanda (*A. cathartica* L.) mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin galat, steroid dan triterpenoid (Kusmiati *et al*. 2014). Senyawa flavonoid mempunyai bermacam-macam efek, yaitu efek antitumor, immunostimulan, antioksidan, analgesik, antivirus, antibakteri, antifungi, antidiare, antihepatotoksik, antihiperqlikemik, dan sebagai vasodilator (Sumastuti & Sonlimar 2002).

B. Simplisia

1. Pengeringan Simplisia

Simplisia adalah istilah yang dipakai untuk menyebut bahan-bahan obat alam yang berada dalam wujud aslinya atau belum mengalami perubahan bentuk. Pengertian simplisia adalah bahan alami yang digunakan untuk obat dan belum mengalami proses apapun, dan kecuali dinyatakan lain umumnya berupa bahan yang dikeringkan (Gunawan dan Mulyani 2004).

Proses pengeringan simplisia mempunyai tujuan terutama untuk menurunkan kadar air sehingga bahan tersebut tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, menghilangkan aktivitas enzim yang bisa merugikan lebih lanjut pada zat aktif, memudahkan dalam hal pengelolaan proses selanjutnya (ringkas, mudah disimpan, dan tahan lama). Faktor yang dapat mempengaruhi pengeringan yaitu waktu pengeringan dan suhu pengeringan. Semakin lama dikeringkan akan semakin kering bahan tersebut. Semakin tinggi suhu akan mempercepat proses pengeringan, tetapi harus dipertimbangkan daya tahan kandungan zat aktif di dalam sel yang kebanyakan tidak tahan panas. Kelembaban udara disekitar dan kelembaban bahan atau kandungan air dari bahan, ketebalan bahan yang dikeringkan, sirkulasi udara, luas permukaan bahan. Semakin luas permukaan bahan akan semakin mudah kering (Gunawan dan Mulyani 2004).

2. Cara Pembuatan

Ada beberapa tahapan yang harus ditempuh untuk pembuatan simplisia. Tahap pertama dimulai dengan pengumpulan bahan baku dan menentukan kualitas bahan baku. Bahan yang telah dikumpulkan tersebut dipilah ketika tanaman masih segar, kemudian dicuci untuk membersihkan kotoran yang melekat pada bahan terutama untuk bahan-bahan yang telah tercemar peptisida. Bahan baku kemudian ditimbang dan dilakukan penetapan kadar zat yang seksama pada sejumlah bahan yang ditimbang (Kepmenkes RI 2010).

C. Ekstraksi

1. Pengertian ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan pekat atau cair yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai (Kusuma GA 2011).

Ekstraksi merupakan sediaan kering, kental atau cair, dibuat dengan mengambil sari simplisia nabati atau hewani dengan cara yang sesuai, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Cairan penyari yang digunakan antara lain air, eter atau campuran etanol air. Penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat menggunakan pelarut yang dipilih sehingga zat yang diinginkan larut. Bahan mentah obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan tidak perlu diproses lebih lanjut kecuali dikumpulkan dan dikeringkan. Metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi untuk memperoleh ekstrak yang sempurna dari obat. Sifat dari bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih suatu metode ekstraksi (Tiwari *et al.* 2011).

2. Metode Maserasi

Metode maserasi (*macerace* : mengairi, melunakkan) merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara serbuk simplisia direndam dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut akan adanya perbedaan konsentrasi. Cairan penyari yang digunakan bisa berupa air, air-etanol atau pelarut lain.

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan serbuk kering simplisia ke dalam maserator, tambahkan pelarut. Rendam sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan. Pisahkan antara maserat dengan cara pengendapan, sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi ulangi proses penyarian sekurang kurangnya dua kali dengan menggunakan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau menggunakan penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI 2009).

3. Fraksinasi

Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama yang lain, merupakan suatu pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dalam suatu tanaman. Pemisahan jumlah dan jenisnya menjadi fraksi yang berbeda, mula mula ekstrak

kental difraksinasi berturut turut dengan larutan penyari yang berbeda beda polaritasnya. Pelarut secara efektif akan memisahkan kelompok kandungan kimia tersebut, mula mula disari dengan pelarut non polar, kemudian disari pelarut kurang polar, dan yang terakhir disari dengan pelarut polar (Harborne 2006).

4. Pelarut

Etanol digunakan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorbsinya baik, dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit (Tiwari *et al.* 2011).

n-heksana adalah hasil penyulingan minyak tanah yang telah bersih, terdiri atas suatu cairan rangkaian hidrokarbon, tidak berwarna, transparan, bersifat mudah terbakar, baunya khas, tidak dapat larut dengan air, dapat larut dengan alkohol, benzene, kloroform dan eter. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut *n*-heksana yaitu senyawa yang bersifat non polar seperti terpenoid, triterpenoid, sterol, dan fenil propanoid (Tiwari *et al.* 2011).

Etil asetat merupakan pelarut yang semi polar, mudah terbakar, dan juga menguap. Etil asetat merupakan suatu cairan jernih, tiak berwarna, bau khas seperti buah, larut dalam 15 bagian air, serta dapat bercampur dengan eter, etanol, dan kloroform. Senyawa yang dapat larut ke dalam pelarut ini adalah glikon maupun aglikon, flavonoid, alkaloid, polifenol, air hingga 3% (Harborne 2007).

Air adalah pelarut universal, yang dapat digunakan untuk ekstrak tanaman dengan produk aktivitas antimikroba. Ekstrak tumbuh tumbuhan organik dari pelarut telah memberikan aktivitas antimikroba yang lebih konsisten dibandingkan dengan ekstrak air. Penggunaan air sebagai cairan penyari kurang menguntungkan, hal ini disebabkan karena zat aktif ikut tersari sehingga zat lain yang diperlukan dapat mengganggu proses penyarian yang akan dilakukan (Tiwari *et al.* 2011).

D. Bakteri Uji

1. Klasifikasi Streptococcus

Klasifikasi *Streptococcus mutans* menurut Samarayanake (2002) sebagai berikut:

Kingdom : Monera
Divisio : Famicutes
Class : Bacili
Order : Lactobacilalles
Family : Streptococcaceae
Genus : Streptococcus
Species : *Streptococcus mutans*

2. Karakteristik Bakteri

S. mutans biasanya ditemukan pada rongga gigi manusia yang luka dan menjadi bakteri yang paling kondusif menyebabkan karies untuk email gigi (Ari 2008). *S. mutans* merupakan bakteri Gram positif, bersifat non motil (tidak bergerak), berdiameter 1-2 μm , bakteri anaerob fakultatif, memiliki bentuk bulat, tersusun seperti rantai dan tidak membentuk spora. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18 – 40°C (Samarayanke 2002).

E. Karies Gigi

1. Definisi karies gigi

Karies merupakan salah satu penyakit di rongga mulut yang prevalensinya di Indonesia masih cukup tinggi. Karies gigi merupakan suatu penyakit infeksi pada jaringan keras gigi, yaitu email, dentin dan sementum. Karies gigi disebabkan aktivitas mikroba pada suatu karbohidrat yang mengalami fermentasi. Karies ditandai oleh adanya demineralisasi pada jaringan keras gigi, diikuti

dengan kerusakan bahan organiknya. Hal ini akan menyebabkan terjadinya invasi bakteri dan kerusakan pada jaringan pulpa serta penyebaran infeksi ke jaringan periapikal (Anonim 2019).

2. Faktor penyebab karies gigi

Karies gigi merupakan penyakit infeksi multifaktorial yaitu terjadinya karies gigi melibatkan banyak faktor. Ada yang membedakan faktor etiologi atau penyebab karies atas factor penyebab primer yang langsung mempengaruhi biofilm (lapisan tipis normal pada permukaan gigi yang berasal dari saliva) dan factor modifikasi yang tidak langsung mempengaruhi biofilm. Karies terjadi bukan disebabkan karena satu kejadian saja seperti penyakit menular lainnya

tetapi disebabkan serangkaian proses yang terjadi selama beberapa kurun waktu. Ada tiga faktor utama yang memegang peranan yaitu faktor host atau tuan rumah, agen atau mikroorganisme, substrat atau diet dan ditambah faktor waktu. Karies gigi terjadi apabila ketiga faktor utama tersebut ada dan saling mendukung.

2.1 Faktor *host*. Faktor ini meliputi morfologi gigi (ukuran dan bentuk gigi), struktur enamel, faktor kimia dan kristalografis. Pit dan fisur pada gigi posterior sangat rentan terhadap karies karena sisa-sisa makanan mudah menumpuk di daerah tersebut terutama pit dan fisur yang dalam. Selain itu, permukaan gigi yang kasar juga dapat menyebabkan plak mudah melekat dan membantu perkembangan karies gigi.

2.2 Faktor *agen*. Faktor agen atau mikroorganisme yaitu adanya bakteri plak gigi. Plak gigi memegang peranan penting dalam menyebabkan terjadinya karies. Plak adalah suatu lapisan lunak yang terdiri atas kumpulan mikroorganisme yang berkembang biak di atas suatu matriks yang terbentuk dan melekat erat pada permukaan gigi yang tidak dibersihkan. Hasil penelitian menunjukkan komposisi mikroorganisme dalam plak berbeda-beda. Kokus gram positif merupakan jenis yang paling banyak dijumpai pada awal pembentukan plak seperti *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* dan *Streptococcus salivarius* serta *Lactobacillus* pada plak gigi.

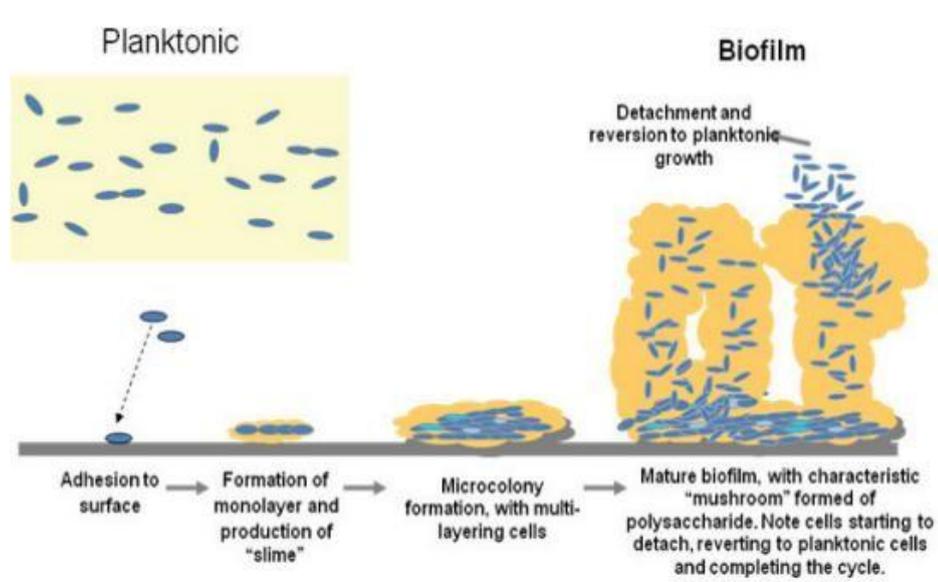
2.3 Faktor *substrat*. Faktor substrat atau diet dapat mempengaruhi pembentukan plak karena membantu perkembangbiakan dan kolonisasi mikroorganisme yang ada pada permukaan enamel. Faktor substrat juga dapat mempengaruhi metabolisme bakteri dalam plak dengan menyediakan bahan-bahan yang diperlukan untuk memproduksi asam serta bahan lain yang aktif yang menyebabkan timbulnya karies. Hasil penelitian menunjukkan bahwa orang yang banyak mengonsumsi karbohidrat terutama sukrosa cenderung mengalami kerusakan pada gigi, sebaliknya pada orang dengan diet yang banyak mengandung lemak dan protein hanya sedikit atau sama sekali tidak mempunyai karies gigi. Hal ini penting untuk menunjukkan bahwa karbohidrat memegang peranan penting dalam terjadinya karies. Selain ketiga faktor tersebut, perkembangan karies gigi tergantung dengan waktu. Lamanya waktu yang dibutuhkan karies untuk berkembang menjadi suatu kavitas cukup bervariasi.

F. Biofilm

1. Definisi Biofilm

Biofilm merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matrik ekstraseluler yang disebut dengan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS), dimana EPS merupakan produk yang dihasilkan sendiri oleh mikroorganisme tersebut dan dapat melindungi dari pengaruh buruk lingkungan (Prakash *et al.* 2003). Matriks biofilm tersusun atas polisakarida, protein dan DNA (Paraje 2011). Bakteri di dalam biofilm mampu bertahan terhadap antibiotik, desinfektan, bahkan mampu tahan terhadap sistem immunitas hospesnya. Manifestasi klinis dari infeksi oleh bakteri pembentuk biofilm adalah adanya resistensi terhadap pengobatan antibiotik. Terapi antibiotik pada umumnya hanya akan membunuh sel-sel bakteri *planktonic* (yang berenang-berenang di luar biofilm) sedang bentuk bakteri yang tersusun rapat dalam biofilm akan tetap hidup dan berkembang serta akan melepaskan bentuk sel-sel *planktonic* keluar dari formasi biofilm. Sistem kekebalan hospes pada formasi biofilm mampu melindungi bakteri di dalamnya dari efektor-efektor sistim imun hospesnya (Davey dan O'toole 2000; Melchior *et al.* 2006).

2. Mekanisme pembentukan biofilm



Gambar 2. Proses pembentukan biofilm (Ranganathan 2014)

Habitat alami mikroorganisme terdiri dari dua, yaitu *planktonic* (bebas) dan sesil (diam). Pembentukan biofilm dimulai dari beberapa bakteri yang hidup

bebas melekat pada suatu permukaan. Penempelan awal ini didasarkan pada daya tarik fisik dan gaya elektrostatik tetapi belum secara kimia, kemudian bakteri memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (monolayer) biofilm. Pembelahan akan berhenti selama beberapa jam dan pada masa ini terjadi banyak sekali perubahan pada sel planktonik, yang akan menghasilkan transisi sel planktonik menjadi sel dengan fenotip biofilm. Sel biofilm berbeda secara metabolik dan fisiologik dari sel planktoniknya.

Sejalan dengan pertumbuhannya, sel biofilm ini akan menghasilkan EPS yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan dan melekatkan satu sama lain untuk membentuk suatu mikrokoloni. *Monolayer* ini dikenal juga sebagai *linking film* yaitu suatu substrat yang menjadi tempat sel bakteri melekat dan membentuk mikrokoloni. Sel-sel akan terus melanjutkan pertumbuhannya dan membentuk lapisan yang makin tebal, maka mikroba yang melekat pada lapisan terdalam permukaan akan kekurangan zat-zat nutrisi dan terjadi akumulasi produk buangan yang bersifat toksik.

Sel bakteri dalam matriks akan mengeluarkan sinyal kimia. Molekul sinyal ini berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang dan dalam koordinasi aktivitas biofilm. Aksi dari sinyal ini merupakan suatu proses dari *quorum sensing* yaitu komunikasi antar sel dan kemampuan molekul untuk mencetuskan suatu aksi bergantung pada konsentrasi sinyal dalam lingkungan.

Biofilm yang matang telah terbentuk dan sekarang terdiri dari banyak spesies bakteri. Biofilm ini juga mungkin berisi jamur, alga, protozoa, jaringan debris dan produk korosi dari pipa saluran. 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. Sel-sel signaling juga mengambil peranan yang penting dalam proses ini.

Pembentukan dari biofilm ini tergantung dari konsententrasi nutrisi yang tersedia dan diatur oleh suatu zat kimia kompleks yang dikeluarkan oleh sel sebagai komunikasi antar sel. Sebagai contoh, ketika hidup bebas, *P. aeruginosa*

menghasilkan molekul signal dalam kadar yang rendah. Tetapi ketika sel *P. aeruginosa* membentuk biofilm maka konsentrasi molekul signal akan meningkat dan menimbulkan perubahan aktifitas dari gen-gen, salah satunya adalah gen yang mengatur sintesis dari alginat untuk pembentukan matriks ekstraseluler (Donlan 2002).

3. Struktur biofilm

Unit struktural dari biofilm adalah mikrokoloni dan proses dasar pembentukan dari biofilm adalah mekanisme quorum sensing, resistensi antimikroba, dan perlekatan yang dapat menerangkan interaksi fisiologis dari mikrokoloni dalam biofilm yang telah matang.

Komponen utama biofilm terdiri dari 15% sel-sel mikroorganisme, 85% materi matriks yang terdiri dari campuran komponen seperti protein, asam nukleat, karbohidrat dan zat lainnya. *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) mungkin menyusun 50-90% karbon organik biofilm dan dapat dianggap sebagai material matrik 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 2002).

4. Faktor-faktor yang mempengaruhi perlekatan sel-sel bakteri dalam pembentukan biofilm

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi perlekatan sel bakteri dalam pembentukan biofilm antara lain efek substratum, kondisi film, hidrodinamik, karakteristik media cairan, dan keadaan permukaan sel bakteri. Efek substratum atau permukaan perlekatan terjadi lebih baik pada permukaan yang kasar, karena akan menurunkan kekuatan aliran yang dapat melepaskan biofilm, dan permukaan yang kasar mempunyai luas permukaan yang lebih besar. Hal lain adalah mikroorganisme lebih baik melekat pada permukaan yang hidrofobik seperti teflon dan plastik dibandingkan pada gelas atau logam. Kondisi film permukaan yang terpapar oleh media cair akan segera ditutupi oleh polimer-polimer dari medium dan menimbulkan modifikasi kimiawi yang akan mempengaruhi pertumbuhan dan perluasan dari perlekatan mikroorganisme pada permukaan tersebut. Contohnya yang terjadi pada enamel gigi yang dilapisi oleh

proteinaceous film yang disebut '*acquired pellice*' dimana sel-sel bakteri akan melekat pada enamel dalam beberapa jam paparan.

Efek hidrodinamik yaitu semakin cepat aliran yang terjadi maka semakin mempercepat perlekatan sel pada permukaan karena sel-sel akan bertubulensi dan berputar. Hal ini terbatas sampai kecepatan tidak melepaskan perlekatan sel-sel dari permukaan. Karakteristik media cairan seperti pH, suhu, jumlah zat gizi, kation dan adanya antimikroba akan mempengaruhi perlekatan. Keadaan permukaan sel bakteri seperti permukaan sel yang hidrofobik, adanya fimbriae, flagel, dan polisakarida atau protein pada permukaan sel bakteri akan mempermudah perlekatan, terutama bila terjadi kompetisi dalam suatu kumpulan mikroorganisme (Coserton dan Stewart 2001).

5. Transfer gen

Biofilm ternyata merupakan tempat yang ideal bagi pertukaran DNA ekstrakromosomal (plasmid). Tingkat konyugasi dalam biofilm lebih tinggi dibanding pada sel-sel yang bebas. Konyugasi ini diperlukan dalam pembentukan biofilm, pilus konyugatif F (dikode oleh operan *tra* pada plasmid) berperan sebagai faktor adesi pada permukaan dan antar sel, sehingga membentuk biofilm tiga dimensi pada *E. coli*. Karena plasmid juga dapat membawa gen yang mengatur resistensi terhadap antibiotika maka biofilm juga berperan dalam penyebaran resistensi bakteri terhadap antibiotika.

6. Quorum sensing

Quorum sensing merupakan suatu proses yang memungkinkan bakteri dapat berkomunikasi dengan mensekresikan molekul sinyal yang disebut autoinduser atau molekul sinyal seperti bahasa. Proses ini memungkinkan suatu populasi bakteri dapat mengatur ekspresi gen tertentu. Konsentrasi autoinduser di lingkungan sebanding dengan jumlah bakteri yang ada. Dengan mendeteksi autoinduser, suatu bakteri mampu mengetahui keberadaan bakteri lain di lingkungannya.

7. Pemeriksaan biofilm

Pemeriksaan biofilm dapat dilakukan dengan mikroskop elektron dan *Concofocal Laser Scanning Microscope* (CLSM). Mikroskop elektron dapat

memeriksa biofilm pada alat-alat medik dan pada infeksi manusia, pada awalnya mikroskop elektron ini merupakan alat yang penting dalam mempelajari biofilm. *Concofocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) dengan fluoresen antisera dan fluoresen in situ hibridisasi, sehingga organisme yang spesifik dan untuk mengidentifikasi dalam komunitas campuran kuman.

8. Faktor resistensi biofilm terhadap antibiotik

Faktor-faktor yang diperkirakan bertanggungjawab terhadap resistensi biofilm adalah penurunan penetrasi dari antimikroba, penurunan tingkat pertumbuhan organisme dalam biofilm, dan ekspresi dari gen resistensi yang spesifik dari biofilm. Berdasarkan penurunan penetrasi dari antimikroba, biofilm terbungkus dalam matriks eksopolimer yang dapat menghambat menghambat difusi dari substansi dan mengikat antibiotika. Penurunan tingkat pertumbuhan organisme dalam biofilm, antimikroba lebih efektif dalam membunuh sel-sel yang tumbuh dengan cepat. Beberapa antibiotika memerlukan secara mutlak sel-sel yang tumbuh dalam mekanisme penghambatannya. Ekspresi dari gen resistensi yang spesifik dari biofilm dapat terlihat pada resistensi biofilm bakteri *P.aeruginosa*, dimana MDR (*Multi Drug Resisten*) *pump* memainkan peranan penting pada konsentrasi antibiotika yang rendah (Lewis 2001; Stewart dan Costerton 2001; Mah dan Toole 2001).

9. Kontrol biofilm

Kontrol biofilm dapat dilakukan dengan cara kimia, fisika dan biologi. Metode kimia yang dilakukan adalah dengan menggunakan suatu bahan kimia yang dapat membunuh atau menghilangkan mikroorganismenya. Senyawa kimia antibiofilm ini dapat menghambat *quorum sensing* sehingga mengganggu pertukaran sinyal kimia antara sel-sel dalam sebuah proses dan dapat merusak matriks biofilm sel-sel bakteri dalam koloni. Metode fisika yang dilakukan adalah dengan sterilisasi panas merupakan metode yang paling banyak dilakukan. Sterilisasi panas dibagi menjadi dua yaitu sterilisasi panas kering dan steriliasasi panas basah. Metode dengan bakteriofage (biologi) dengan memanfaatkan virus tertentu untuk menginfeksi bakteri. Virus akan menghancurkan bakteri dengan cara masuk ke dalam sel inang dan melekat pada reseptor spesifik pada

permukaan bakteri, sehingga bakteri akan mati dan terjadinya penurunan biofilm (Pratiwi 2008).

G. Landasan Teori

Bakteri adalah suatu organisme yang jumlahnya paling banyak dan tersebar luas. Bakteri merupakan penyebab utama terjadinya penyakit karies gigi, bakteri *S. mutans* merupakan bakteri umum penyebab karies gigi. Bakteri ini membentuk tumpukan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) dimana EPS merupakan produk yang dihasilkan sendiri oleh mikroorganisme tersebut dan dapat melindungi dari pengaruh buruk lingkungan, yang disebut biofilm (Prakash, *et al.* 2003).

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. Pembentukan dental plak sebagai biofilm berhubungan dengan pertumbuhan biofilm. Faktor yang berhubungan dengan pertumbuhan biofilm adalah kemampuan adesi, aliran nutrisi, dan koagregasi. Hal ini akan mempengaruhi pertumbuhan rata-rata, ekspresi gen dan tingkat virulensi biofilm.

Kontrol biofilm sejauh ini dilakukan dengan tiga cara, yaitu secara kimia, fisika, dan biologi. Kontrol biofilm secara kimia dapat dilakukan dengan penambahan zat kimia tertentu contohnya seperti enzim berbasis deterjen. Sedangkan secara fisika dapat dilakukan dengan cara sterilisasi panas. Kontrol biofilm secara biologi dengan menggunakan bakteriofage dan interaksi biologis. Masih sangat dibutuhkan alternatif lain untuk mengatasi masalah biofilm, penggunaan bahan alam masih diutamakan, karena toksisitas rendah, biaya murah dan mudah didapatkan.

Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat adalah daun alamanda (*A. cathartica* L.). adapun kandungan dari daun alamanda yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri adalah senyawa flavonoid. Tidak menutup kemungkinan daun alamanda juga memiliki aktivitas antibiofilm, karena ekstrak tanaman yang mengandung flavonoid berpotensi dapat menghambat *intercellular*

adhesion genes icaA dan *icaD* yang menjadi salah satu faktor pembentukan biofilm (Lee *et al.* 2013). Berdasarkan penelitian (Kusmiati, *et al.* 2014) serbuk dan ekstrak daun alamanda (*A. cathartica* L.) mengandung senyawa golongan saponin triterpen, saponin merupakan senyawa yang memiliki tegangan permukaan yang kuat yang berperan sebagai antimikroba dengan mengganggu kestabilan membran sel bakteri yang menyebabkan lisis sel.

Metode yang digunakan adalah maserasi kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi dengan berbagai macam pelarut, pelarut yang digunakan antara lain etanol, *n*-heksana, etil asetat, dan air. Etanol melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinin, flavonoid, steroid, damar, klorofil, tanin, dan saponin. Lemak dan malam hanya sedikit yang larut (List 2000). *n*-heksana melarutkan senyawa-senyawa nonpolar, misalnya golongan kandungan kimia minyak atsiri, lemak, dan asam lemak tinggi, steroid dan triterpenoid dan karotenoid (Kristijono 2008). Senyawa yang larut dalam pelarut etil asetat adalah flavonoid, alkaloid alkohol, polifenol (Harborne 2007).

Sedangkan, air melarutkan garam alkohol, minyak menguap, glikosida, tanin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, pectin, zat warna dan asam organik (List 2000).

Berdasarkan ketiga macam pelarut tersebut, diduga fraksi teraktif yang terdapat dalam ekstrak etanol daun alamanda terhadap penghambatan pembentukan biofilm bakteri *S. mutans* ATCC 25175 adalah fraksi etil asetat, karena adanya kandungan senyawa zat aktif daun alamanda yang larut dalam pelarut etil asetat seperti flavonoid dan alkaloid. Flavonoid merupakan komponen terbesar golongan fenol yang terdapat di dalam tumbuhan alam dan memiliki daya antimikroba dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein yang larut dengan dinding sel bakteri (Ardananurudin *et al.* 2004), sedangkan alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri yang diduga dapat mengganggu kemampuan penyusunan peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Robinson 1995).

Pengujian pembentukan biofilm pada penelitian ini diuji secara *in vitro* menggunakan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* (Chamdit and Siripermpool

2012). Pengujian aktivitas penghambatan biofilm bertujuan untuk mendapatkan aktivitas dari daun alamanda dalam menghambat pertumbuhan biofilm *S. mutans* secara *in vitro* menggunakan *microtiterplater flat-bottom polystyrene 96 wells*. Pengujian dilakukan dengan cara ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat, air dan media dimasukkan secara bersamaan ke dalam tiap *well* dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24jam. Hasil uji berupa *Optical Density* (OD) dibaca menggunakan alat *Bio-rad microplate reader Benchmark* pada panjang gelombang maksimum. Persentase penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dinyatakan dengan IC_{50} (*Inhibition Concentration*) yaitu konsentrasi senyawa uji yang menghambat biofilm sebesar 50%. Nilai IC_{50} ditentukan dari persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persentase penghambatan biofilm. Selanjutnya akan dilakukan pengumpulan dan analisis data berdasarkan pengukuran yang telah dilakukan.

H. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah:

Pertama, Ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun alamanda (*A. cathartica* L.) mempunyai aktivitas dalam menghambat pertumbuhan biofilm *S. mutans* ATCC 25175.

Kedua, Fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun alamanda (*A. Cathartica* L.) mempunyai aktivitas paling efektif dalam menghambat pertumbuhan biofilm *S. mutans* ATCC 25175.

Ketiga, ekstrak, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun alamanda (*A. cathartica* L.) mampu menghambat 50% biofilm *S. mutans* ATCC 25175.