

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN
PANDAN WANGI (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.)
TERHADAP *Streptococcus mutans* strain 2302-UNR
SECARA *IN-VITRO***

TUGAS AKHIR

Untuk memenuhi persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Gigi



Oleh:

Kalistha Primivanny Harsono

NIM. 0910740038

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN PANDAN WANGI (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) TERHADAP *Streptococcus mutans* strain 2302-UNR SECARA IN-VITRO

Oleh:

Kalitha Primivanny Harsono

NIM. 0910740038

Telah diuji pada:

Hari : Jumat

Tanggal : 21 Desember 2012

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

drg. Miftakhul Cahyati, Sp.PM

NIP. 19770803 201012 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt.,Msi

NIP. 19540823 198103 2 001

drg. Kuni Ridha Andini, Sp.Ort.

NIP. 780709 07 1 2 0067

Mengetahui:

Ketua Program studi Pendidikan Dokter Gigi

Dr. drg. M. Chair Effendi, SU, Sp.KGA

NIP.19530618 197912 1 005

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) Terhadap *Streptococcus mutans strain* 2302-UNR Secara *In-Vitro*” untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar sarjana kedokteran gigi.

Pada penulisan tugas akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA, sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan saya kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Dr. M. Chair Effendi, drg. SU. Sp.KGA sebagai Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan saya kesempatan menuntut ilmu di Program Studi Pendidikan Dokter Gigi.
3. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., Msi. sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bantuan *reagens*, yang dengan sabar membimbing untuk bisa menulis dengan baik, dan senantiasa memberi semangat, sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. drg. Kuni Ridha Andini, Sp.Ort. sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar telah membimbing penulisan dan analisis data, dan senantiasa memberi semangat, sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

5. drg. Miftakhul Cahyati, Sp.PM. selaku dosen penguji atas saran dan kritik yang diberikan, sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. drg. Yuanita Lely Rachmawati, M.kes, atas bimbingan singkat yang diberikan dalam pengolahan data statistik penelitian ini.
7. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
8. Para analis di Laboratorium Mikrobiologi (Mas Slamet, Bu Uci dan Bu Yanti) yang telah membantu saya dalam menyelesaikan penelitian ini.
9. Kepada keluarga saya di Bekasi dan Surabaya. Ayah Poerbadi Harsono, Mama Dyana Andriyani, Irvano Gibransyah Harsono, Eyang, Tante Sulis, Retha, dan Ibu Tutik. Terima kasih atas segala doa, nasehat dan bimbingan dan semangat yang telah diberikan.
10. Kepada Hendrajat Parmana Putra yang sangat membantu dalam penyelesaian penelitian ini dan memberikan semangat.
11. Kepada teman-teman saya, Dwi Oktavia BPS, Krisnina Mahadewi, Yona One Sidarta, Okties Hertanti, Indah Aprilia dan Angel Agnes yang telah membantu dalam penulisan, memberikan saran dan memberikan semangat.
12. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 9 Desember 2012



ABSTRAK

Harsono, Kalistha Primivanny. 2012. **Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) Terhadap *Streptococcus mutans* strain 2302-UNR Secara In-Vitro**. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt.,Msi, (2) drg. Kuni Ridha Andini, Sp.Ort

Streptococcus mutans adalah bakteri Gram positif dalam rongga mulut yang metabolismenya menghasilkan zat asam yang menjadi penyebab karies gigi. Untuk menghambat atau membunuh *Streptococcus mutans* dapat digunakan antibakteri. Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) mengandung zat antibakteri antara lain alkaloid, saponin, flavonoida, tanin, dan polifenol. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) memiliki efek antimikroba terhadap *Streptococcus mutans* secara in-vitro. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen laboratorium yang dilakukan terhadap *Streptococcus mutans* dengan metode dilusi tabung dan *streaking* pada BHI agar. Kelompok perlakuan yaitu kelompok bakteri yang diberi ekstrak daun pandan wangi dengan konsentrasi 5%; 10%; 15%; 20%; 25% dan 30%. Kelompok kontrol terdiri dari kontrol bakteri dan kontrol bahan/ ekstrak daun pandan wangi. Hasil penelitian menunjukkan Kadar Hambat Minimum (KHM) diperoleh pada konsentrasi ekstrak 10% atau konsentrasi akhir 5%, sedangkan Kadar Bunuh Minimum (KBM) pada konsentrasi ekstrak 30% atau konsentrasi akhir 15%. Analisis data menunjukkan uji Anova tidak dapat memenuhi syarat ($p < 0,05$), sehingga analisis dilakukan dengan uji nonparametrik Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis menunjukkan ada perbedaan jumlah koloni pada pemberian konsentrasi ($p < 0,05$). Uji korelasi Spearman menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara konsentrasi ekstrak daun pandan wangi dengan jumlah koloni *Streptococcus mutans* yang tumbuh ($R = -0,993$; $p < 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun pandan wangi menghambat dan membunuh pertumbuhan serta mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* secara *in vitro*, dengan KHM diperoleh pada konsentrasi ekstrak 10% atau konsentrasi akhir 5% serta KBM pada konsentrasi ekstrak 30% atau konsentrasi akhir 15%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun pandan wangi semakin rendah tingkat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

Kata Kunci : ekstrak daun pandan wangi, *Streptococcus mutans*, antibakteri

ABSTRACT

Harsono, Kalistha Primivanny. 2012. **Antibacterial Activity of Pandan Wangi leaves Extract (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) for *Streptococcus mutans* strain 2302-UNR In-Vitro**. Final Assignment, Dentistry Program, Faculty of Medicine University of Brawijaya. Supervisor: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt.,Msi, (2) drg. Kuni Ridha Andini, Sp.Ort

Streptococcus mutans is a Gram-positive bacteria in oral cavity which metabolism produces acid as the common cause of dental caries. In order to prevent the growth or kill *Streptococcus mutans*, antibacterial agent is required. Pandan wangi leaves Extract (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) is suspected to contain antibacterials substances such as alkaloid, saponin, flavonoida, tannin and polifenol. This research is conducted to prove the antibacterial effect of pandan wangi leaves have antimicroba effect for *Streptococcus mutans* strain 2302-UNR In-Vitro. An experimental study design is carried out to *Streptococcus mutans* with tube dilution method and streaking on the Brain Heart agar plate. The treated groups are group treated with pandan wangi leaves extract with a range concentration from 5%; 10%; 15%; 20%; 25% and 30%. The control groups consist of bacteria control and pandan wangi leaves extract control. Result of the research indicates that Minimum Inhibitory Concentration (MIC) is found at concentration extract 10% or final concentration 5% of the pandan wangi leaves extract, where as the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is found at concentration extract 30% or final concentration 15% of the extract. Data analysis shows that Anova test is failed to fulfill the qualification ($p < 0,05$), therefore the data analysis is conducted with non parametric test of Kruskal Wallis. Kruskal Wallis test shows at least there is difference of the number of colonies as the given concentration ($p < 0,05$). The correlation test of Spearman reveals a strong association between concentration of pandan wangi leaves extract and the number of *Streptococcus mutans* colonies growth (Correlation, $R = -0,993$, $p < 0,05$). The conclusion is pandan wangi leaves extract has an effect on the growth as well as bactericidal effect on *Streptococcus mutans* strain 2302-UNR In-Vitro. With MIC at concentration extract 10% or final concentration 5% and MBC at concentration extract 30% or final concentration 15%. The higher concentration of pandan wangi leaves extract, the lower growth rate of *Streptococcus mutans*.

Keywords: pandan wangi extract, *Streptococcus mutans*, antibacterial

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak	v
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
Daftar Simbol, Singkatan dan Istilah	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Daun Pandan Wangi	5
2.1.1 Klasifikasi Daun Pandan Wangi	5

2.1.2	Morfologi Daun Pandan Wangi	5
2.1.3	Kandungan Kimia.....	6
2.1.4	Sifat Antibakteri Daun Pandan Wangi	6
2.1.5	Bahan Aktif Daun Pandan Wangi.....	8
2.2	<i>Streptococcus mutans</i>	11
2.2.1	Klasifikasi	11
2.2.2	Morfologi <i>Streptococcus mutans</i>	11
2.2.3	Faktor Virulensi <i>Streptococcus mutans</i>	12
2.2.4	<i>Streptococcus mutans</i> dan Karies.....	12
2.2.5	Identifikasi <i>Streptococcus mutans</i>	13
2.3	Karies Gigi.....	14
2.3.1	Patogenesis Karies Gigi.....	14
2.3.2	Pencegahan Karies Gigi	15
2.3.2.1	Hilangkan Substrat Karbohidrat.....	15
2.3.2.2	Tingkatkan Ketahanan Gigi.....	15
2.3.2.3	Hilangkan Plak Bakteri.....	15
2.4	Uji Aktivitas Antibakteri.....	16
2.4.1	Agar Difusi	16
2.4.1.1	Cara Kirby Bauer.....	16
2.4.1.2	Cara Sumuran.....	17
2.4.1.3	Cara Pour Plate.....	17
2.4.2	Dilusi Tabung atau Dilusi Agar.....	18

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konsep	20
-----	-----------------------	----

3.2 Hipotesis Penelitian	21
--------------------------------	----

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian	22
-----------------------------	----

4.2 Tempat Penelitian	22
-----------------------------	----

4.3 Variabel Penelitian	22
-------------------------------	----

4.3.1 Variabel Independen.....	22
--------------------------------	----

4.3.2 Variabel Dependen.....	23
------------------------------	----

4.4 Besar Sampel	23
------------------------	----

4.5 Alat dan Bahan Penelitian	24
-------------------------------------	----

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Daun Pandan Wangi.....	24
-------------------------------------------------------------	----

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri.....	24
------------------------------------------------------	----

4.5.3 Alat dan Bahan Pembenihan Cair Bakteri.....	24
---------------------------------------------------	----

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung.....	24
---------------------------------------------------	----

4.6 Definisi Operasional.....	24
-------------------------------	----

4.7 Prosedur Penelitian	26
-------------------------------	----

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi 100%.....	26
-----------------------------------------------------	----

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi.....	26
------------------------------------------------	----

4.7.3 Identifikasi Bakteri	27
----------------------------------	----

4.7.4 Pemiakan Bakteri dengan BHI <i>broth</i>	29
------------------------------------------------------	----

4.7.5 Penyiapan Bakteri Uji.....	30
----------------------------------	----

4.7.6 Prosedur Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pandan Wangi	
----------------------------------------------------------	--

Menggunakan Metode Dilusi Tabung.....	30
---------------------------------------	----

4.7.7 Prosedur Penelitian Pendahuluan.....	30
--------------------------------------------	----

4.8 Skema Persiapan Penelitian	31
--------------------------------------	----

4.9 Analisis Data.....	33
------------------------	----



BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Ekstraksi Etanol Daun Pandan Wangi.....	34
5.2 Hasil identifikasi <i>Streptococcus mutans</i>	34
5.3 Hasil Pengamatan Uji Pendahuluan Metode Well-Difussion (Sumuran).....	37
5.4 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri dengan Penentuan Nilai KHM...	37
5.5 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri dengan Penentuan Nilai KBM.....	40
5.6 Analisis Data	44

BAB 6 PEMBAHASAN..... 48

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan.....	56
7.2 Saran.....	56

DAFTAR PUSTAKA 58

LAMPIRAN..... 61

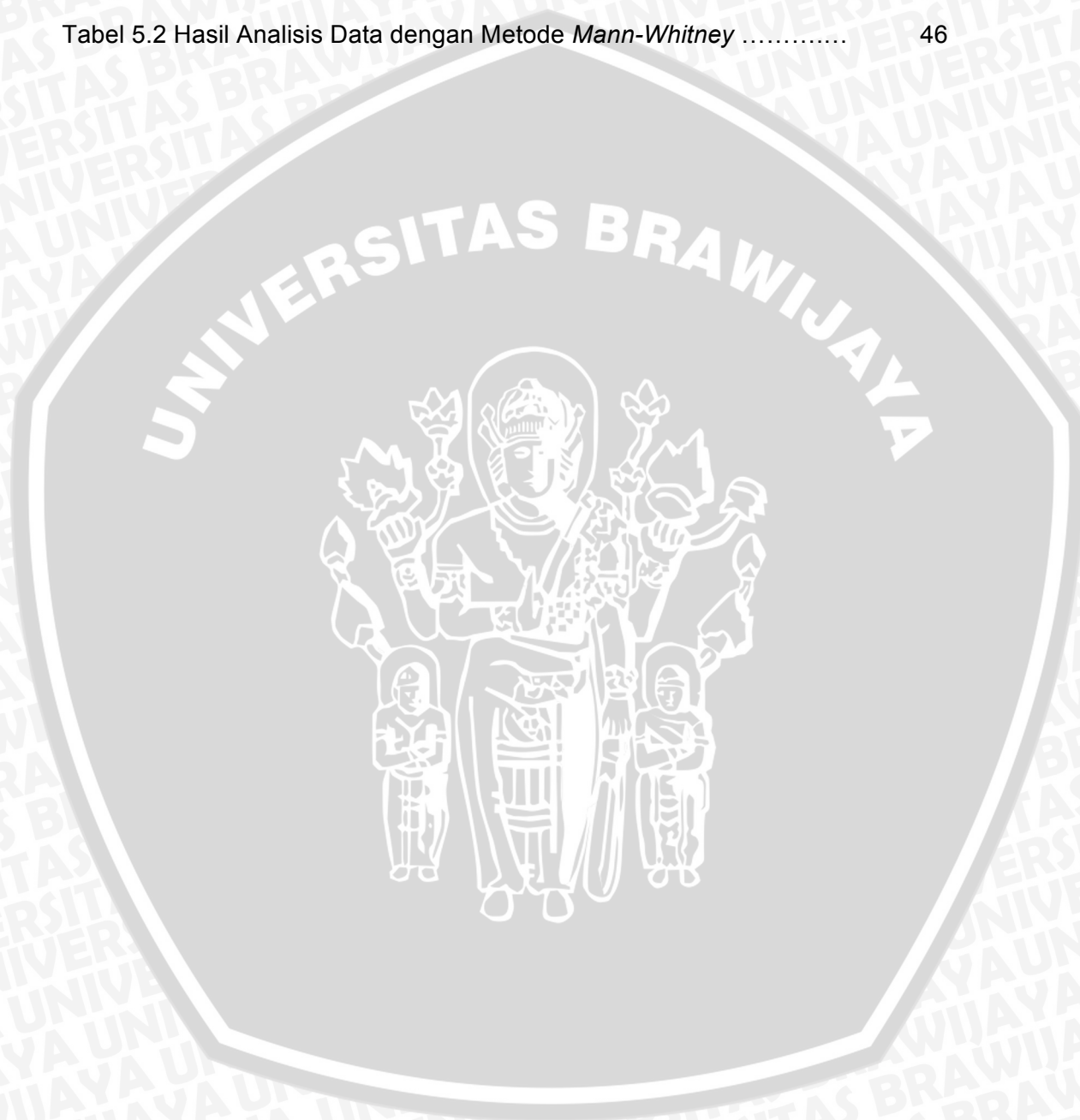


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Pandan Wangi	5
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual	20
Gambar 4.1 Skema Persiapan Penelitian	31
4.1.(a) Skema Persiapan Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	31
4.1.(b) Skema Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi.....	31
Gambar 4.2 Prosedur Uji Antimikroba.....	32
Gambar 5.1 Pengecatan Gram pada <i>Streptococcus mutans</i>	35
Gambar 5.2 Tes Katalase <i>Streptococcus mutans</i>	35
Gambar 5.3 Tes <i>optochin</i> pada <i>Streptococcus mutans</i>	36
Gambar 5.4 Tes Fermentasi Karbohidrat Terhadap Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>	36
Gambar 5.5 Plate BHI yang Telah Diinokulasi <i>Streptococcus mutans</i> dengan Sumuran Berisi Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi	37
Gambar 5.6 Hubungan Peningkatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi dengan Tingkat kekeruhan	38
Gambar 5.7 Hasil Uji Dilusi Agar dengan Berbagai Tingkat Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi	39
Gambar 5.8 Pertumbuhan Koloni <i>Streptococcus mutans</i> pada BHI agar ..	41
Gambar 5.9 Grafik Hubungan Jumlah Koloni <i>Streptococcus mutans</i> dengan Konsentrasi Ekstrak Daun Pandan Wangi.....	43

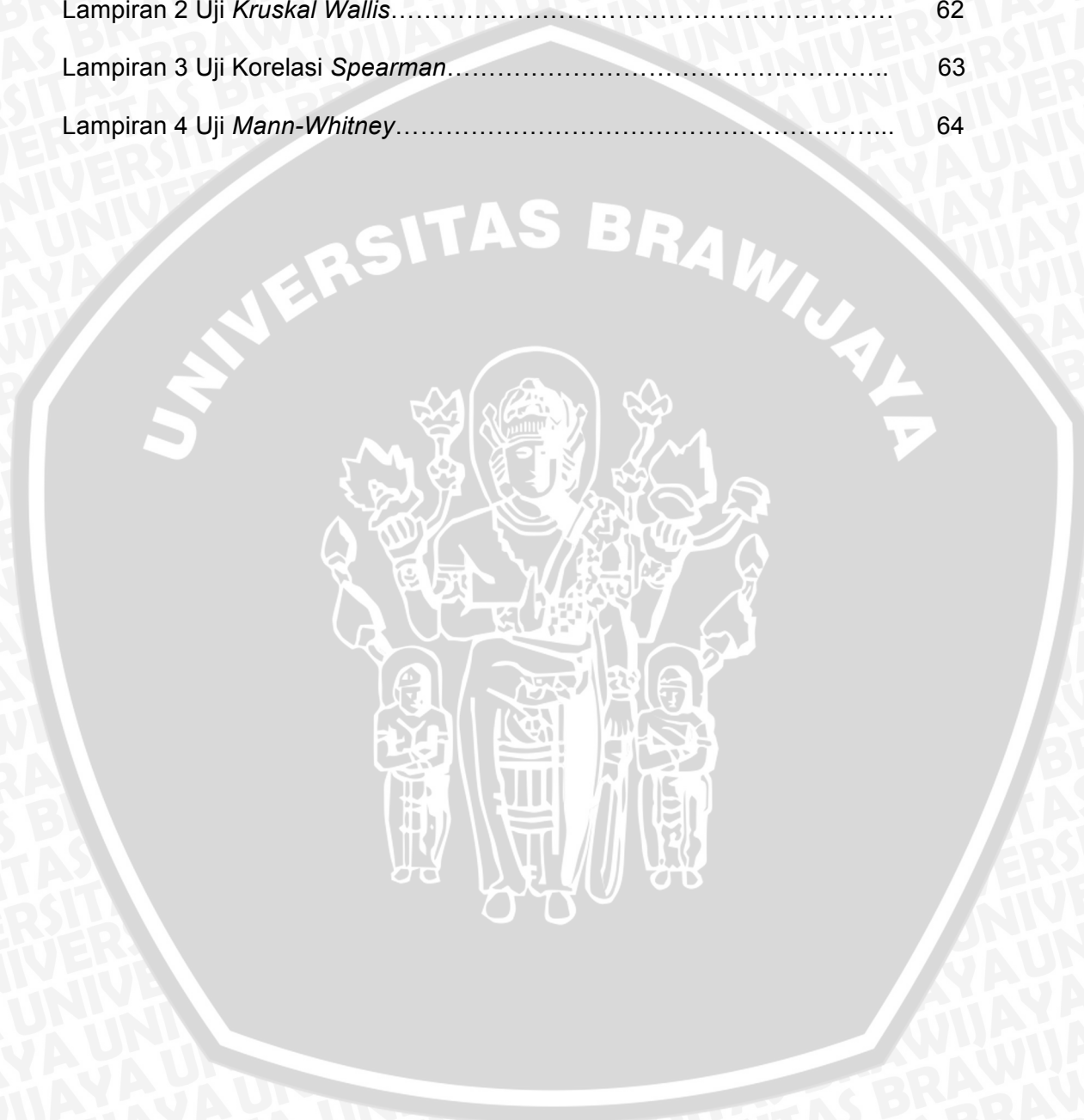
DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Koloni Bakteri yang Tumbuh Pada BHI agar	42
Tabel 5.2 Hasil Analisis Data dengan Metode <i>Mann-Whitney</i>	46



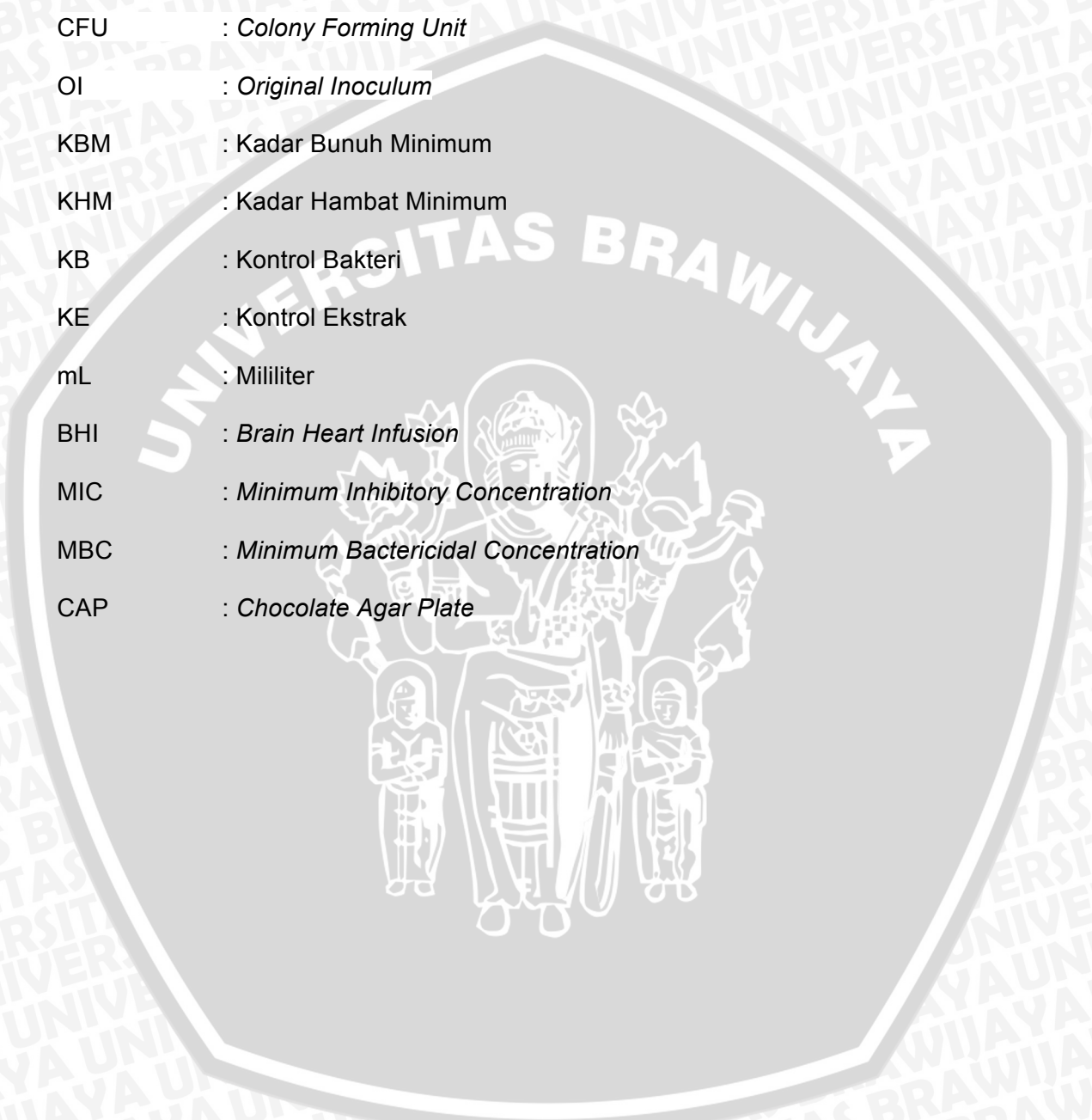
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Uji Normalitas.....	61
Lampiran 2 Uji <i>Kruskal Wallis</i>	62
Lampiran 3 Uji Korelasi <i>Spearman</i>	63
Lampiran 4 Uji <i>Mann-Whitney</i>	64



DAFTAR SIMBOL, SINGKATAN, DAN ISTILAH

CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
OI	: <i>Original Inoculum</i>
KBM	: Kadar Bunuh Minimum
KHM	: Kadar Hambat Minimum
KB	: Kontrol Bakteri
KE	: Kontrol Ekstrak
mL	: Mililiter
BHI	: <i>Brain Heart Infusion</i>
MIC	: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MBC	: <i>Minimum Bactericidal Concentration</i>
CAP	: <i>Chocolate Agar Plate</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karies adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh interaksi antara bakteri plak, diet dan gigi. Tidak diragukan lagi bahwa tanpa plak, maka tidak akan timbul karies. Plak didominasi oleh bakteri *Streptococcus mutans*, bakteri ini bersifat kariogenik karena mampu dengan segera membentuk asam dari karbohidrat yang dapat diragikan (Pratiwi, 2005).

Streptococcus mutans dapat menempel pada permukaan gigi karena kemampuan untuk membuat polisakarida ekstrasel. Polisakarida ekstrasel ini terutama terdiri dari polimer glukosa yang menyebabkan matriks plak mempunyai konsistensi seperti gelatin, sehingga bakteri terbantu untuk melekat pada gigi serta saling melekat satu sama lain. Plak makin lama makin tebal, hal ini akan menghambat fungsi saliva untuk melakukan aktivitas antibakteri (Pratiwi, 2005).

Upaya preventif terhadap karies antara lain aplikasi fluor topikal dan pemakaian penutup (*sealant*) yang memerlukan bantuan dokter gigi (Baum, 1997) serta merupakan prosedur yang membutuhkan biaya. Sementara upaya kuratif dengan penumpatan merupakan prosedur yang relatif mahal dan masih dapat beresiko menimbulkan karies sekunder. Bila prosedur penumpatan tidak dapat dilakukan saat itu juga, maka



diberikan obat penghilang rasa sakit atau mematikan saraf gigi agar pasien tidak merasa sakit. Sehingga memakan waktu dan biaya yang lebih banyak lagi (Pickard, 2002). Oleh karena itu muncul alternatif penggunaan bahan alami sebagai usaha pencegahan karies.

Keuntungan penggunaan bahan alami herbal adalah bahan baku yang digunakan mudah diperoleh dan harga yang relatif murah. Selain itu efek samping lebih kecil bila dibandingkan dengan obat yang berasal dari bahan kimia. Delapan puluh persen penduduk Indonesia hidup di pedesaan dan terkadang sulit dijangkau oleh tim medis dan obat-obat modern. Biaya pengobatan modern yang mahal menyebabkan masyarakat kebanyakan berpaling ke obat tradisional yang berasal dari alam. Selain keuntungan tersebut di atas, obat tradisional terdapat dalam jumlah yang banyak di Indonesia (Putri, 2010).

Bahan herbal yang banyak digunakan untuk pencegahan maupun pengobatan karies antara lain sirih, teh serta siwak yang telah banyak diteliti memiliki sifat antibakteri. Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) juga merupakan salah satu bahan tradisional yang mengandung bahan kimia antibakteri seperti alkaloid, saponin, flavonoida, tanin, polifenol dan zat warna (Dede *et al*, 2009), namun belum diteliti bagaimana sifat antibakteri daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti ingin mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*, sehingga bahan ini

diharapkan dapat dikembangkan sebagai bahan alternatif untuk obat kumur dan pasta gigi pencegah karies. Dalam penelitian ini, daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) akan diekstrak dengan cara maserasi menggunakan etanol 96% . Penelitian ini dilakukan secara *in-vitro* dengan menguji Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus Mutans strain* 2302-UNR secara *in-vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus mutans strain* 2302-UNR secara *in-vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan Khusus penelitian ini adalah:

1.3.2.1 Mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) dengan pertumbuhan *Streptococcus mutans strain* 2302-UNR secara *in-vitro*.

1.3.2.2 Mengetahui KHM dan KBM ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) bermanfaat sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans strain* 2302-UNR secara *in-vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai:

1.4.1 Manfaat Akademis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar bagi penelitian selanjutnya dalam pengembangan obat herbal antibakteri yang efektif, alamiah dan murah dari daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) khususnya dalam bidang kedokteran gigi.

1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai informasi ilmiah bagi masyarakat mengenai penggunaan bahan obat tradisional, khususnya daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) guna meningkatkan upaya preventif dalam pengobatan karies gigi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Pandan Wangi

2.1.1 Klasifikasi Daun Pandan Wangi

Divisi : *Spermatophyta*

Anak Divisi : *Angiospermae*

Kelas : *Monocotyledoneae*

Bangsa : *Pandanales*

Suku : *Pandanaceae*

Marga : *Pandanus*

Spesies : *Pandanus amaryllifolius* Roxb. (Sri et al, 2008)



Gambar 2.1 Tanaman Pandan Wangi (iptek.net.id)

2.1.2 Morfologi Daun Pandan Wangi

Pandanus umumnya merupakan pohon atau semak yang tegak, tinggi 3 – 7 m, bercabang, kadang-kadang batang berduri, dengan akar tunjang sekitar pangkal batang. Daun pandan wangi besar, panjang 2 - 3 m, lebar 8 – 12 cm, ujung daun segitiga lancip-lancip, tepi daun dan ibu tulang daun bagian bawah berduri, tekstur daun berililin, berwarna hijau muda/hijau tua. Bunga jantan dan betina terdapat pada tumbuhan yang berbeda. Letak buah terminal atau lateral, soliter atau berbentuk bulir atau malai yang besar (Sri et al, 2008).

2.1.3 Kandungan Kimia

Daun pandan wangi mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, polifenol, minyak atsiri dan zat warna (Dede et al, 2009).

2.1.4 Sifat Antibakteri Daun Pandan Wangi

Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu

integritas membran sel bakteri. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dapat bersifat koagulator bakteri (Farida *et al*, 2007).

Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Farida *et al*, 2007).

Tanin memiliki aktivitas antibakteri, tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringen tanin dapat menginduksi pembentukan senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan suatu kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. Namun pendapat lain mengatakan bahwa tanin diduga dapat mengerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel, permeabilitas sel yang terganggu menyebabkan sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhan sel terhambat atau bahkan mati. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi fungsi materi genetik (Farida *et al*, 2007).

Minyak atsiri berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses pembentukan membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna. Sebagian besar minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri mengandung gugus fungsi hidroksil dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses *adsorpsi* yang melibatkan ikatan hydrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami

peruraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis (Farida *et al*, 2007)

Dalam penelitian ini, bahan kimia daun pandan wangi yang akan diuji sebagai antibakteri adalah flavonoid. Flavonoida mempunyai sifat kimia seperti senyawa fenol, yang bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa. Tetapi harus diingat, bila dibiarkan dalam larutan basa, dan disamping itu terdapat oksigen, banyak yang akan terurai. Karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil, atau suatu gula, flavonoida merupakan senyawa polar, sehingga flavonoid cukup larut dalam pelarut polar seperti Etanol (EtOH), Metanol (MeOH), Butanol (BuOH), Aseton, Dimetilsulfoksida (DMSO), atau Dimetilformamida (DMF). Oleh karena itu, daun pandan wangi dalam penelitian ini diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 96% (Farida *et al*, 2007). Penggunaan metode maserasi disebabkan karena sifat kelarutan bahan aktif daun pandan wangi yang banyak terserap melalui metode ini.

2.1.5 Bahan Aktif Daun Pandan Wangi

2.1.5.1 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir semua senyawa alkaloid berasal dari tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Hampir semua alkaloid yang ditemukan di alam mempunyai keaktifan biologis tertentu dan ada yang sangat berguna bagi pengobatan misalnya

kuinin, morfin dan stiknin adalah alkaloida yang terkenal dan mempunyai efek fisiologis dan psikologis. Alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian tumbuhan, umumnya alkaloid ditemukan dalam kadar yang kecil dan harus dipisahkan dari campuran senyawa yang berasal dari jaringan tumbuhan . Alkaloid merupakan senyawa nitrogen heterosiklik (Hartati, 2010).

Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Selain itu mekanisme kerja dari alkaloid dihubungkan dengan kemampuan untuk berinteraksi dengan DNA. Bahan aktif fitokimia polifenol, flavanoid, dan alkaloid dilaporkan memiliki aktifitas antimikroba yang cukup baik (Farida *et al*, 2007).

2.1.5.2 Saponin

Saponin adalah glikosida triterpen (*terpenoid -like*) atau steroid yang terdistribusi luas dalam tumbuhan dan telah dilaporkan lebih dari 500 jenis tumbuhan mengandung saponin. Saponin diklasifikasikan berdasarkan *aglycone skeleton* yang dimiliki. Kelompok pertama adalah non-steroidal saponin (saponin triterpen) yaitu saponin yang paling banyak ditemui pada *monocotyledonous angiosperm*. Struktur saponin triterpen terdiri dari satu atau lebih glikosida hidrofilik yang dikombinasikan dengan derivat triterpen yang bersifat lipofilik.

Senyawa saponin dapat bekerja sebagai antimikroba. Senyawa saponin merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Farida *et al*, 2007).

2.1.5.3 Tanin

Tanin adalah senyawa fenolik kompleks yang memiliki berat molekul 500-3000. Tanin dibagi menjadi dua kelompok atas dasar tipe struktur dan aktivitas tanin terhadap senyawa hidrolitik terutama asam, tanin terkondensasi (*condensed tannin*) dan tanin yang dapat dihidrolisis (*hydrolyzable tannin*) (Farida *et al*, 2007).

Menurut Okuda (2004) tanin berpotensi menjadi antibakteri. Bakteri Gram-positif lebih sensitif terhadap polifenol tertentu daripada sifat sensitifitas yang sama untuk bakteri Gram. Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanisme yang diperkirakan adalah sebagai berikut : toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan suatu kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. Tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat permeabilitas sel yang terganggu, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhan sel terhambat atau bahkan mati. Tanin juga mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik. Efek antibakteri tanin antara

lain melalui: reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Farida *et al*, 2007).

Dari sifat antibakteri senyawa tanin, maka tanin dapat digunakan sebagai obat anti-radang, anti-diare, pengobatan infeksi pada kulit dan mulut serta pengobatan luka bakar. Oleh karena itu, tanin sebagai antibakteri dapat digunakan dalam bidang pengobatan (Farida *et al*, 2007).

2.1.5.4 Flavanoid

Flavanoid telah disintesis oleh tanaman dalam responnya terhadap infeksi mikroba sehingga efektif secara *in-vitro* terhadap sejumlah mikroorganisme. Flavanoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Cowan, 1999).

Flavanoid merupakan senyawa fenol dan senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein. Mekanisme kerja senyawa antibakteri golongan fenolik dengan cara bereaksi dengan lapisan fosfolipid pada membran sel, menyebabkan gangguan permeabilitas membran sel atau perubahan komponen asam-asam lemak (kandungan fosfolipid), dilanjutkan dengan kebocoran parsial isi sitoplasma, sehingga sel bakteri tidak dapat berkembang biak (bakteriostatik) (Farida *et al*, 2007).

2.2 *Streptococcus mutans*

2.2.1 Klasifikasi

Kingdom	: Monera
Divisio	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Order	: Lactobacilales
Family	: Streptococcaceae
Genus	: Streptococcus
Species	: <i>Streptococcus mutans</i> (Nugraha,2008).

2.2.2 Morfologi *Streptococcus Mutans*

Streptococcus mutans merupakan bakteri gram positif, bersifat nonmotil (tidak bergerak), bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk kokus yang sendirian berbentuk bulat atau bulat telur dan tersusun dalam rantai. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 18⁰ - 40⁰ C. *Streptococcus mutans* ditemukan pada rongga gigi manusia yang luka dan menjadi bakteri yang paling kondusif menyebabkan karies untuk email gigi (Nugraha, 2008).

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

2.2.3 Faktor Virulensi *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans memiliki sifat dapat bertahan hidup dalam lingkungan asam (asidurik) dan dapat menghasilkan asam (asidogenik). Bakteri ini juga memanfaatkan enzim *glukosiltransferase* (GTF) dan *fruktosiltransferase* (FTF) yang berfungsi untuk mengubah sukrosa menjadi dekstran dan fruktan (Samaranayake, 2007).

Beberapa strain dari bakteri *Streptococcus mutans* merupakan bakteri yang sangat asidogenik, dan pada pH rendah serta tersedia sukrosa mampu menghasilkan simpanan polisakarida intraseluler yang dimetabolisme untuk melanjutkan produksi asam selama beberapa saat (Cawson, 2002).

2.2.4 *Streptococcus mutans* dan Karies

Habitat primer *Streptococcus mutans* adalah mulut, faring, dan usus. Beberapa faktor seperti perlekatan pada permukaan enamel, produksi metabolit asam, kapasitas membentuk cadangan glikogen dan kemampuan sintesis polisakarida ekstraseluler tampak pada karies gigi. *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sobrinus* memiliki peran penting dalam etiologi karies gigi, karena dapat melekat pada pelikel saliva enamel dan bakteri plak lain (Forssten, 2010).

Streptococcus mutans dapat memproduksi asam kuat dan menyebabkan lingkungan asam yang menciptakan resiko karies. Kadang kemunculan *Streptococcus mutans* pada gigi akan diikuti terjadinya karies setelah 6-24 bulan. *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sobrinus* yang asidogenik dapat membentuk *extracellular polysaccharides* (EPS)

ketika ada sukrosa, tapi juga dapat berasal dari fruktosa dan glukosa (Forssten, 2010).

2.2.5 Identifikasi *Streptococcus mutans*

Untuk membedakan Gram positif dan Gram negatif dilakukan pewarnaan Gram pada *Streptococcus mutans*. Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x, didapatkan gambaran sel bakteri berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong berantai. Bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan warna ungu pada pewarnaan Gram yang menunjukkan bakteri ini merupakan Gram positif.

Untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* dilakukan tes katalase. Tes katalase dilakukan dengan memberikan tetesan Hidrogen Peroksida pada *Streptococcus mutans*. Pada pengamatan hasil tes katalase, *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil negatif karena tidak tampak adanya gelembung udara.

Untuk membedakan *Streptococcus pneumoniae* yang peka terhadap *optochin* dan *Streptococcus mutans* yang resisten terhadap *optochin* dilakukan tes *optochin*. *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil yang kurang sensitif. Hasil ini ditunjukkan dengan zona hambatan <14 mm di sekeliling disk *optochin*.

Identifikasi *Streptococcus mutans* yang terakhir adalah tes fermentasi karbohidrat. Tes ini dilakukan untuk mengetahui jenis karbohidrat apa saja yang dapat difermentasi oleh *Streptococcus mutans*. Hasil tes ini menunjukkan sukrosa, rhamnosa dan sorbitol dapat difermentasi oleh *Streptococcus mutans*.

2.3 Karies Gigi

2.3.1 Patogenesis Karies Gigi

Penyakit yang disebabkan oleh *Streptococcus mutans* adalah karies gigi. Beberapa hal yang menyebabkan karies gigi bertambah parah adalah gula, air liur dan juga bakteri pembusuk. Setelah mengkonsumsi gula, terutama sukrosa dan setelah beberapa menit penyikatan gigi dilakukan, glikoprotein yang lengket pada gigi memulai pembentukan plak. Pada waktu yang bersamaan, berjuta-juta bakteri yang dikenal sebagai *Streptococcus mutans* bertahan dalam glikoprotein itu. Walaupun banyak bakteri lain yang juga melekat, hanya *Streptococcus mutans* yang dapat menyebabkan karies gigi. Setelah itu *Streptococcus mutans* menggunakan fruktosa dalam suatu metabolisme glikolisis untuk memperoleh energi. Hasil akhir dari glikolisis dalam kondisi anaerob adalah asam laktat. Asam laktat ini menciptakan kadar asam yang tinggi untuk menurunkan pH yang dalam jumlah tertentu dapat menghancurkan zat kapur fosfat di dalam email gigi sehingga mendorong pembentukan suatu karies (Nugraha, 2008).

2.3.2 Pencegahan Karies Gigi

Dasar-dasar pencegahan karies adalah modifikasi satu atau lebih dari tiga faktor utama penyebab karies, yaitu: plak, substrat karbohidrat dan kerentanan gigi. Karies membutuhkan waktu bulanan sampai tahunan untuk menghancurkan gigi. Secara teori, terdapat tiga cara untuk mencegah karies yaitu:

2.3.2.1 Hilangkan substrat karbohidrat

Tidak perlu menghilangkan secara total karbohidrat dari makanan kita. Yang diperlukan hanyalah mengurangi frekuensi konsumsi gula dan membatasi pada saat makan saja. Hal ini dianggap cara pencegahan yang paling efektif (Kidd dan Bechal, 1992).

2.3.2.2 Tingkatkan ketahanan gigi

Email dan dentin yang terbuka dapat dibuat lebih resisten terhadap karies dengan mengaplikasikan fluor secara tepat. Kerentanan pit dan fisur yang dalam dapat dikurangi dengan menutup menggunakan resin (Kidd dan Bechal, 1992).

2.3.2.3 Hilangkan Plak Bakteri

Secara teoritis, permukaan gigi yang bebas plak tidak akan berkembang menjadi karies. Tetapi penghilangan total plak secara teratur bukanlah pekerjaan yang mudah. Namun tidak semua bakteri dalam plak mampu meragikan gula sehingga memungkinkan untuk mencegah karies dengan jalan mengurangi bakteri kariogenik saja, yaitu *Streptococcus mutans* (Kidd dan Bechal, 1992).

2.4 Uji Aktivitas Antibakteri

2.4.1 Agar Difusi

Media yang dipakai adalah *Mueller Hinton* (MH). Metode difusi ini terdiri atas beberapa cara, yaitu :

2.4.1.1 Cara Kirby Bauer

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 mL BHI cair, diinkubasikan 5-8 jam pada 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standart konsentrasi bakteri 10^6 CFU per mL. Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapas tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Kertas samir (*disk*) yang mengandung antibakteri kemudian diletakkan di atas permukaan media agar yang telah diolesi suspensi bakteri, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 9-24 jam, lalu hasil inkubasi dibaca :

- a) Zona radikal yaitu suatu daerah di sekitar *disk* dimana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Potensi antibakteri diukur dengan menghitung diameter dari zona radikal dalam satuan milimeter.
- b) Zona irradikal yaitu suatu daerah di sekitar *disk* dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh antibakteri tetapi tidak dimatikan (Hermawati, 2011).

2.4.1.2 Cara Sumuran



Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 mL BHI cair, diinkubasi pada 37°C selama 5-8 jam. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standart antibakteri 10⁶ CFU per mL. Kapas lidi steril dicelupkan kedalam suspensi bakteri lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapas tidak terlalu basah, kemudian dioleskan pada permukaan media agar hingga rata, setelah itu pada media agar dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu, ke dalam sumuran diteteskan larutan antibakteri, diinkubasi pada 37°C. Hasilnya dibaca seperti pada cara *Kirby Bauer* (Setyorini, 2011).

2.4.1.3 Cara Pour Plate

Beberapa koloni kuman dari pertumbuhan 24 jam diambil, disuspensikan ke dalam 0,5 mL BHI cair, diinkubasi 5-8 jam selama 37°C. Suspensi ditambah akuades steril hingga kekeruhan tertentu sesuai dengan standart antibakteri 10⁶ CFU per mL. Suspensi diambil satu ose dan dimasukkan ke dalam 4 mL agar base 1,5% yang mempunyai temperatur 50°C. Setelah suspensi kuman tersebut homogen, kemudian dituang ke dalam media agar *Mueller Hinton*, ditunggu sebentar sampai agar tersebut membeku, *disk* diletakkan di atas media dan diinkubasi 15-20 jam dengan temperatur 37°C. Hasil dibaca sesuai dengan standar masing-masing antibakteri (Setyorini, 2011).

2.4.2 Dilusi Tabung dan Dilusi Agar

2.4.2.1 Dilusi Tabung

Metode ini digunakan untuk mengukur MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) atau KHM (Kadar Hambat Minimum) dan MBC (*Minimum Bacteridal Concentration* atau KBM (Kadar Bunuh Minimum). Metode ini menggunakan bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml dan menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap (Setyorini, 2011).

Masing-masing tabung berisi bahan antimikroba yang telah diencerkan secara serial diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan kekeruhan pada tabung diamati. Kadar Hambat minimal (KHM) atau *Minimal Inhibition Concentration* (MIC) adalah konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri ditandai dengan tidak tampak kekeruhan pada tabung setelah diinkubasi 18-24 jam atau semalaman. Biakan dari semua tabung jernih diinokulasi pada agar padat, diinkubasikan dan keesokan hari diamati ada atau tidak koloni yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang menunjukkan pertumbuhan koloni tidak lebih dari 0,1% dari *Original Inoculum* adalah KBM dari obat uji tersebut (Finegold *et al.*, 2007).

Metode dilusi tabung diperkirakan merupakan metode yang paling akurat dalam menentukan kepekaan untuk mengukur jumlah (baik unit maupun organisme) dari sebuah agen antimikroba (Finegold *et al.*, 2007). Keuntungan metode ini adalah

bahwa uji tersebut memungkinkan hasil kuantitatif, dimana menunjukkan jumlah obat tertentu yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme yang diuji (Setyorini, 2011).

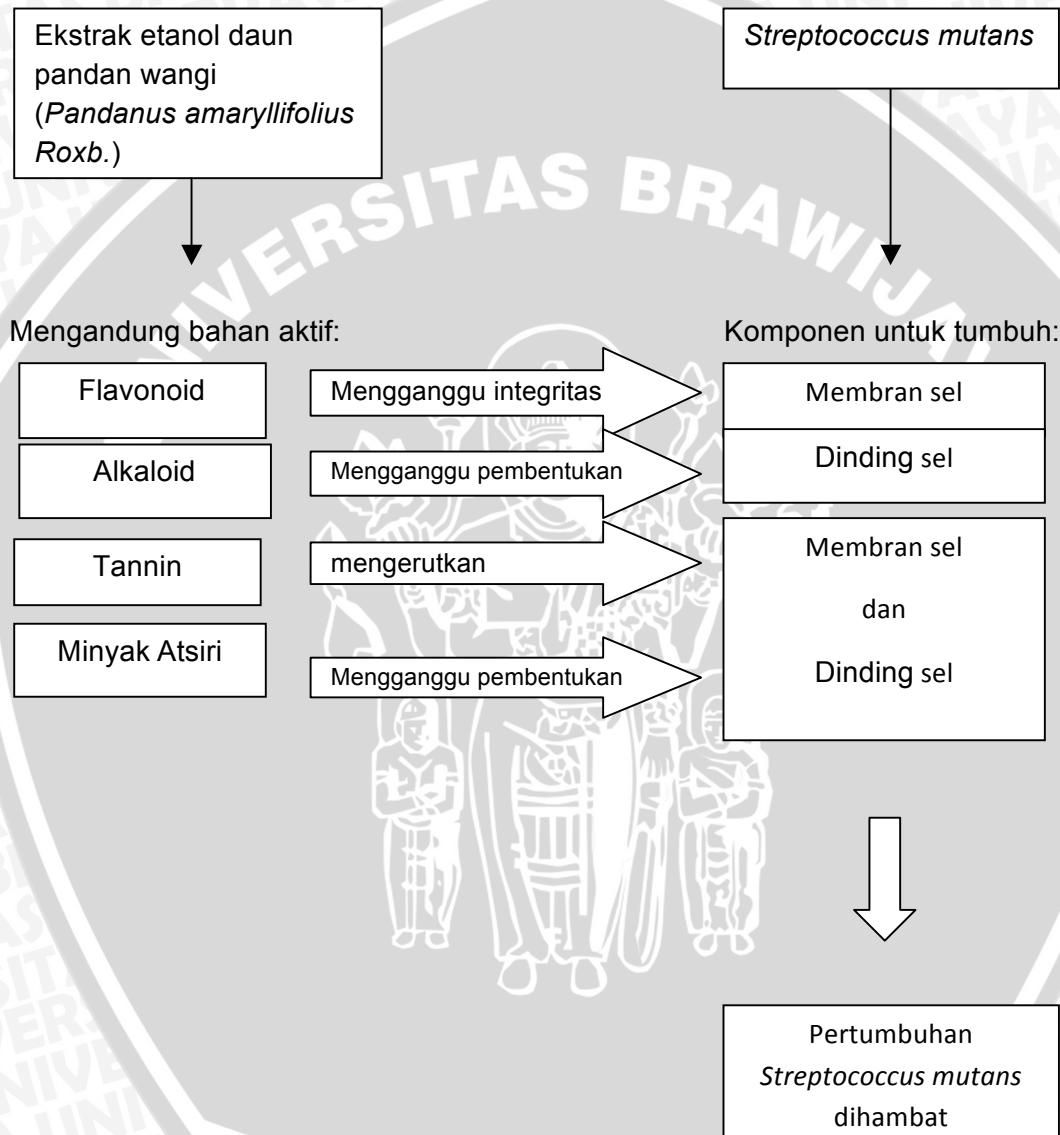
2.4.2.2 Dilusi Agar

Prinsip metode dilusi agar sama dengan dilusi tabung, yang membedakan adalah pada dilusi agar menggunakan medium padat. Antimikroba dicampurkan ke dalam cawan petri berisi agar, kemudian agar dibiarkan mengeras dan disimpan pada refrigerator pada suhu 5°C sampai siap dipakai. Inokulum bakteri diteteskan pada agar ketika hari perlakuan sekitar 0,001 ml atau menggunakan pipet dengan konsentrasi 10⁴. Inkubasi *cawan petri* pada suhu 35°C selama 16-18 jam kemudian dapat dilihat terdapat pertumbuhan bakteri atau tidak (Finegold *et al.*, 2007).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan:

Daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) mengandung alkaloid, saponin, flavonoida, tanin, polifenol dan zat warna (Dede *et al*, 2009). Senyawa tersebut diketahui memiliki sifat antibakteri.

Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Alkaloid mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Tanin diduga dapat mengerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel. Minyak atsiri berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Farida *et al*, 2007).

Dengan adanya aktivitas dari senyawa-senyawa diatas, maka daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) dikatakan memiliki efek antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dengan cara mengganggu pembentukan berbagai komponen penyusun bakteri sehingga dapat menyebabkan kematian pada bakteri tersebut.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) menghambat pertumbuhan atau membunuh *Streptococcus mutans* secara *in-vitro*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratorik dengan metode dilusi tabung untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap *Streptococcus mutans* secara *in vitro*.

Metode ini diawali dengan uji pendahuluan dengan metode sumuran, kemudian dilanjutkan dengan tahap pengujian bahan di media cair dengan tujuan untuk mencari seberapa besar Kadar Hambat Minimum (KHM) dan tahap penggoresan pada media BHI agar yang ditujukan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak daun pandan wangi.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan antara bulan Februari - Mei 2012.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Independen

Variabel independen pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun pandan wangi dengan konsentrasi 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%. Yang dapat ditentukan setelah melakukan penelitian pendahuluan. Rentang konsentrasi ekstrak 5% digunakan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) yang lebih tepat serta untuk mendapatkan persamaan regresi yang lebih teliti. Jarak ini



masih dianggap ideal karena jarak yang terlalu dekat (<1%) akan menyebabkan tingkat kesalahan pengambilan ekstrak meningkat.

4.3.2 Variabel Dependen

Variabel dependen pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus Mutans*.

4.4 Besar Sampel

Dalam penelitian ini, besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus estimasi besar sampel menurut (Lukito, 1998) sebagai berikut :

$$p(n - 1) \geq 16$$

Dalam penelitian ini digunakan 6 macam perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda dan 1 jenis isolate bakteri *S. mutans* sebagai kontrol kuman, maka :

$$p = 6 + 1 \text{ (kontrol)} = 7$$

$$p(n - 1) \geq 16$$

$$7(n - 1) \geq 16$$

$$7n - 7 \geq 16$$

$$7n \geq 23$$

$$n \geq 3,3 \sim 3$$

Keterangan :

n = jumlah sampel

Jadi, jumlah sampel yang harus digunakan untuk mendapatkan hasil yang dapat dipercaya adalah sebanyak 3 pengulangan.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Daun Pandan Wangi

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk ekstraksi daun pandan wangi adalah *erlenmeyer steril*, timbangan ukur, pisau, beberapa helai daun pandan wangi, etanol 96%, gelas ukur, *freezer*, *mortar* dan *pestle*

4.5.2 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk identifikasi bakteri adalah isolat bakteri *Streptococcus mutans*, bahan pengecat Gram, minyak emersi, ose, mikroskop, api spiritus, *object glass* dan kertas penghisap

4.5.3 Alat dan Bahan Pembenihan Cair Bakteri

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk pembenihan cair bakteri adalah tabung reaksi, BHI (*Brain Heart Infusion Broth*), pipet pengencer (*ependorf*) dan inkubator

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

Alat dan bahan yang dibutuhkan untuk uji dilusi tabung adalah tabung reaksi, pipet steril, inkubator, ekstrak etanol daun pandan wangi, pembenihan bakteri yang sudah distandarisasikan, aquades steril, rak tabung reaksi, spidol, kertas label, *vortex*, BHI agar dan media BHI (*Brain Heart Infusion Broth*).

4.6 Definisi Operasional

- Daun pandan wangi yang digunakan adalah daun pandan wangi muda yang terletak pada bagian atas dari tanaman pandan wangi, dipetik dari pohon milik ibu kos di kota Malang dan dipetik pada pagi hari supaya

daun pandan wangi yang akan diekstrak dalam keadaan segar dan kandungan yang terserap diharapkan lebih maksimal.

- Ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) merupakan daun pandan wangi kering yang diekstrak dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi.
- Isolat *Streptococcus Mutans* adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan jumlah 1 isolat. Isolat *Streptococcus Mutans* ini berasal dari rongga mulut pasien.
- Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus Mutans* yang diperoleh dengan membandingkan secara kualitatif tingkat kekeruhan larutan ekstrak daun pandan wangi yang telah diberi bakteri uji tersebut dalam media BHI *broth*.
- Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun pandan wangi yang mampu membunuh bakteri yang dinilai secara kuantitatif, ditandai dengan jumlah koloni pada medium BHI agar yang telah dilakukan *streaking* dengan satu ose larutan ekstrak daun pandan wangi yang telah diberi bakteri uji tersebut, dengan jumlah koloni bakteri $<0,1\%$ *original inoculum*
- *Original Inoculum* adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi 10^3 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat dan digunakan untuk mencari kategori KBM

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi 100%

- a. Daun pandan wangi kering seberat 100 gram dihaluskan.
- b. Tambahkan 150 ml etanol 96% dan didiamkan selama 24 jam.
- c. Larutan dituang dalam suatu wadah.
- d. Penambahan etanol 96% diulang hingga larutan berwarna bening.
- e. Larutan disaring
- f. Hasil selanjutnya dievaporasi (untuk memisahkan pelarut etanol dengan ekstrak daun pandan wangi menggunakan bantuan alat *rotavapor*).
- g. Diperoleh larutan ekstrak daun pandan wangi.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi (5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30% v/v)

- a. Ekstrak daun pandan wangi 30% v/v dibuat dengan cara mengambil 0,3 ml ekstrak 100% ditambah 0,7 ml aquades.
- b. Ekstrak daun pandan wangi 25% v/v dibuat dengan cara mengambil 0,25 ml ekstrak 100% ditambah 0,75 ml aquades.
- c. Ekstrak daun pandan wangi 20% v/v dibuat dengan cara mengambil 0,2 ml ekstrak 100% ditambah 0,8 ml aquades.
- d. Ekstrak daun pandan wangi 15% v/v dibuat dengan cara mengambil 0,15 ml ekstrak 100% ditambah 0,85 ml aquades.
- e. Ekstrak daun pandan wangi 10% v/v dibuat dengan cara mengambil 0,1 ml ekstrak 100% ditambah 0,9 ml aquades.
- f. Ekstrak daun pandan wangi 5% v/v dibuat dengan cara mengambil 0,05 ml ekstrak 100% ditambah 0,95 ml aquades.

- g. Kontrol Bakteri (KB) = biakan *Streptococcus Mutans* (1 ml 10^6 CFU/ml) + 1ml aquades.
- h. Kontrol Ekstrak (KE) = 1 ml ekstrak 100% + 1ml aquades.

4.7.3 Identifikasi Bakteri

4.7.3.1 Pewarnan Gram

- a. Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan udara.
- b. Sesudah kering difiksasi di atas api Bunsen.
- c. Sediaan dituangi Kristal violet selama 1 menit
- d. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- e. Sediaan dituangi Lugol selama 1 menit.
- f. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air.
- g. Sediaan dituangi Alkohol 96% selama 5-10 detik.
- h. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- i. Sediaan dituangi Safranin selama 0,5 menit.
- j. Sisa bahan warna dibuang dan dibilas dengan air
- k. Dikeringkan dengan kertas penghisap
- l. Diamati dengan mikroskop pembesaran total 400x dengan intensitas sinar rendah.
- m. *Streptococcus Mutans* menunjukkan warna ungu pada pewarnaan gram, berbentuk bulat dan berantai. *Streptococcus Mutans* bersifat Gram Positif (Dzen,2006).



4.7.3.2 Uji Katalase

Untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan menambahkan larutan H_2O_2 3% pada pembenihan cair. *Streptococcus* akan memberikan hasil negatif yang ditunjukkan dengan tidak munculnya gelembung udara.

Langkah-langkah uji katalase sebagai berikut:

- a. Buat suspensi bakteri pada *object glass*
- b. Tambahkan 1 tetes larutan salin/aquades steril pada gelas objek
- c. Tambahkan 1 ose koloni bakteri
- d. Tetesi dengan 1 tetes H_2O_2 3%
- e. Amati timbulnya gelembung-gelembung udara pada media pembenihan.
- f. *Streptococcus mutans* menunjukkan tidak ada gelembung (Dzen,2006).

4.7.3.3 Tes Hemolisa Optochin

- a. Membagi *Chocolate Agar Plate* menjadi empat kuadran
- b. Melakukan *streaking* 1 atau 1½ kuadran pada *CAP*
- c. Letakkan *optochin* disk di tengah inokulum dengan penjepit steril
- d. Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar
- e. Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator
- f. Amati zona hambatan di sekeliling disk.
- g. *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil reaksi negatif (resisten terhadap *optochin*).

4.7.3.4 Tes Fermentasi Karbohidrat

- a. Mempersiapkan bakteri *Streptococcus mutans* usia kultur (24-48 jam)
- b. Mengambil dengan menggunakan ose
- c. Mengencerkan dengan NaCl kemudian divortex
- d. Menyiapkan *microbact* 12B
- e. Memberi larutan karbohidrat masing-masing pada ceruk pertama sampai terakhir, dengan urutan : gelatin, malonate, inositol, sorbitol, rhamnose, sukrosa, laktosa, arabinose, adonitole, rafinose, salicin, arginin.
- f. Pada setiap ceruk masing-masing diberi bakteri *Streptococcus mutans* sebanyak 0,1 mL
- g. Inkubasi *microbact* yang telah diberi bakteri tersebut selama 12-18 jam.
- h. *Streptococcus mutans* menunjukkan reaksi terhadap karbohidrat jenis sorbitol, rhamnose dan sukrosa dengan menunjukan perubahan warna menjadi kuning.

4.7.4 Pemiakan Bakteri dengan BHI broth

Streptococcus mutans yang telah diidentifikasi dibiakan pada medium cair dengan menggunakan BHI broth selama 1 x 24 jam pada suhu 37° C.

4.7.5 Penyiapan Bakteri Uji

Ambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optis dengan spektrofotometer pada $\lambda = 625 \text{ nm}$. Dari hasil

yang diperoleh dibuat pembenihan cair bakteri yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml.

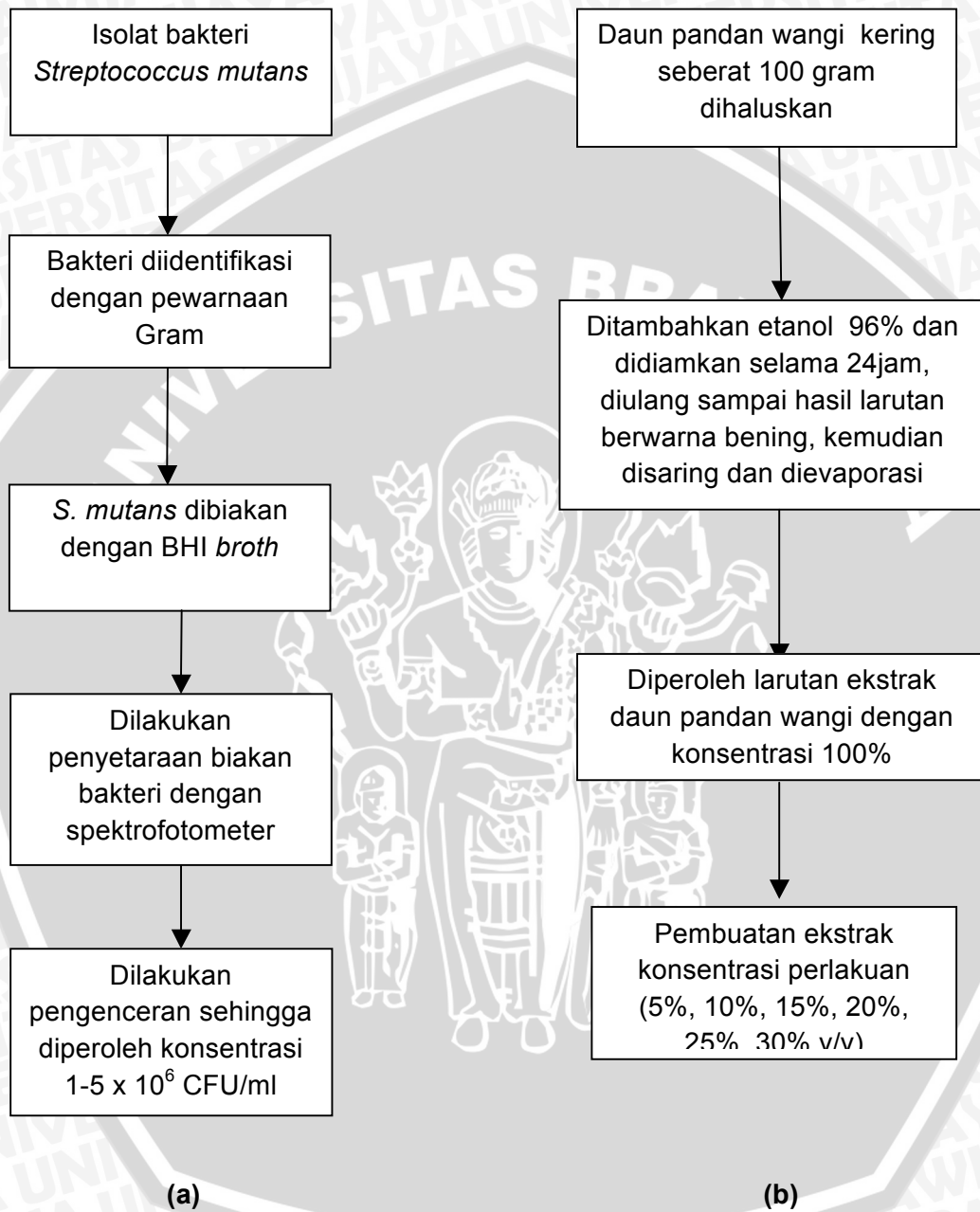
4.7.6 Prosedur Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pandan Wangi Menggunakan Metode Dilusi Tabung

Prosedur yang dilakukan yaitu siapkan tabung reaksi untuk koloni *S.mutans* yang dibiakan dalam BHI dan telah disetarakan dengan spektrofotometer. Kemudian siapkan ekstrak dalam berbagai konsentrasi. Siapkan pula kontrol ekstrak dan kontrol bakteri. Kemudian tambahkan *Streptococcus mutans* pada masing-masing tabung konsentrasi ekstrak dan tabung kontrol bakteri. Inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, lihat kekeruhan pada tabung. Dari kekeruhan ini didapat nilai KHM. Setelah itu diambil satu ose dan dibiakan dalam media BHI agar. Kemudian diinkubasi dalam suasana anaerob selama 1 x 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, dilihat *colony forming unit* yang terbentuk. Dari hasil tersebut, ditentukan nilai KBM.

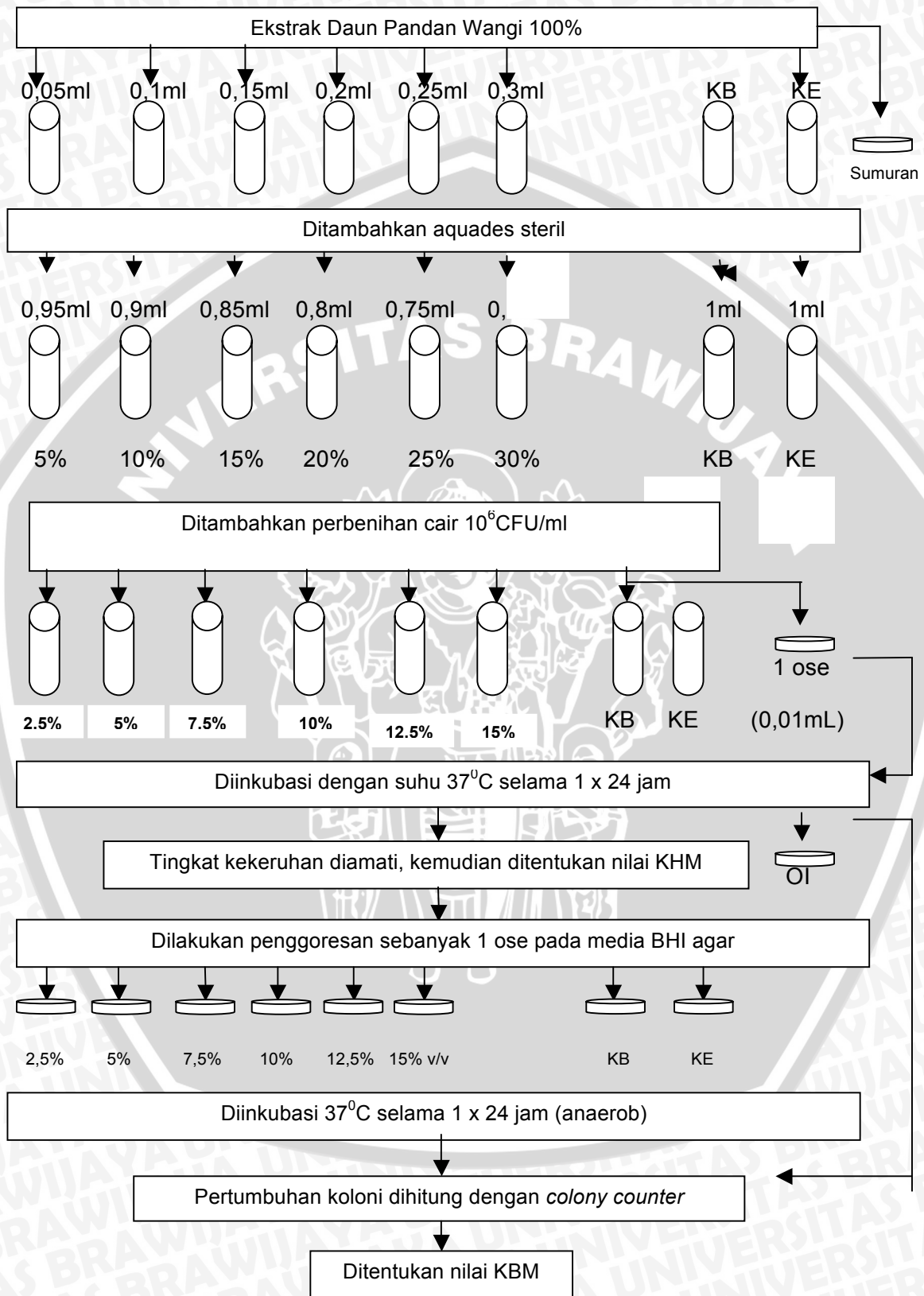
4.7.7 Prosedur Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan digunakan untuk pencarian konsentrasi. Diawali dengan konsentrasi ekstrak 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125% dan 1,56%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut hingga dicapai ekstrak daun pandan wangi dengan konsentrasi 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%.

4.8 Skema Persiapan Penelitian



Gambar 4.1. (a) Skema Persiapan Bakteri *Streptococcus mutans* dan (b) Skema Pembuatan Ekstrak Daun Pandan Wangi



Gambar 4.2. Prosedur Uji Antimikroba

4.9. Analisis Data

Setelah diperoleh hasil dari 3 kali pengulangan percobaan, kemudian data-data jumlah koloni yang tumbuh dianalisis dengan menggunakan uji statistik non parametrik dan uji statistik korelasi *Spearman*. Dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) uji statistik *Kruskal Wallis* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun pandan wangi terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Sedangkan uji korelasi *Spearman* digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan konsentrasi ekstrak daun pandan wangi terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans* dan mengetahui bagaimana sifat hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan menjadi penurunan jumlah koloni dan sebaliknya atau tidak berhubungan. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 19.0.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Ekstraksi Etanol Daun Pandan Wangi

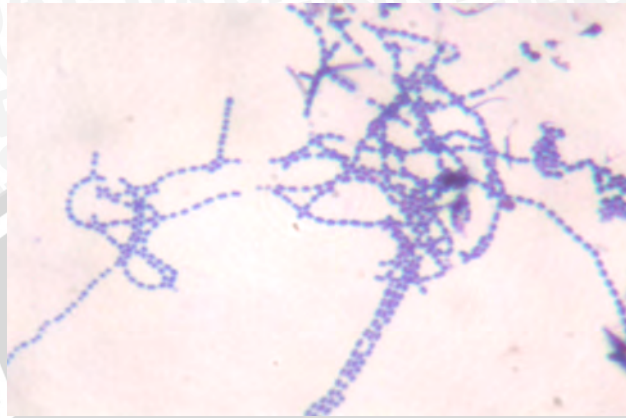
Ekstrak etanol daun pandan wangi berwarna hitam. Ekstrak etanol daun pandan wangi berbentuk cair dan jika dicampur dengan aquades larutan tersebut bersifat homogen dengan warna hitam kecoklatan. Apabila larutan tersebut dicampurkan dengan *Brain Heart Infusion* (BHI) *Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C akan terdapat larutan homogen berwarna hitam kecoklatan pada hasil medium. 100 gram daun pandan wangi yang sudah dikeringkan akan menghasilkan 15ml ekstrak etanol daun pandan wangi.

5.2 Hasil Identifikasi *Streptococcus mutans*

Isolat bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan oleh peneliti diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Sebelum bakteri digunakan, dilakukan uji identifikasi terlebih dahulu untuk memastikan bakteri tersebut adalah benar *Streptococcus mutans*. Isolat bakteri digoreskan ulang di BHI agar kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan Gram lalu dilanjutkan dengan tes katalase, tes *optochin* dan tes fermentasi karbohidrat.

Hasil penggoresan pada medium BHI agar isolat bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan koloni bakteri yang berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung. *Streptococcus mutans* memiliki tekstur halus, licin dan terkadang saling bertumpuk. Koloni bakteri *Streptococcus mutans* sangat lengket pada BHI agar. Koloni berwarna kuning keputihan dan agak transparan. Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x, didapatkan gambaran sel bakteri berbentuk bulat, lonjong atau bulat

lonjong berantai. Bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan warna ungu pada pewarnaan gram seperti terlihat pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Pengecatan Gram Pada *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan warna ungu pada pewarnaan Gram, berbentuk bulat, dan berantai

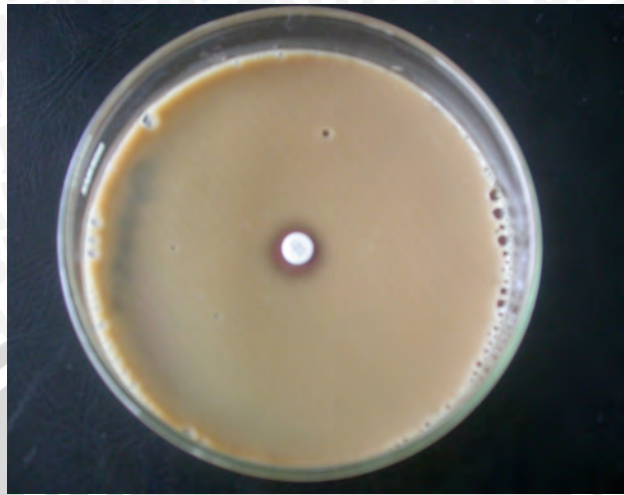
Pada pengamatan hasil tes katalase, *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil negatif karena tidak tampak adanya gelembung udara seperti terlihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Tes Katalase *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans menunjukkan hasil negatif

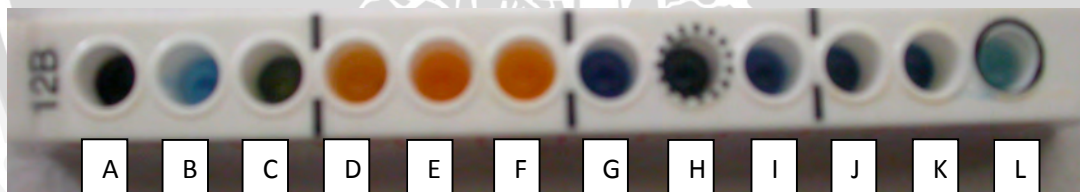
Pada tes *optochin* bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil reaksi negatif. Hasil negatif ini ditunjukkan dengan zona hambatan < 14mm di sekeliling disk *optochin* seperti terlihat pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Tes optochin pada *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan hasil negatif dengan tidak tampak adanya zona hambatan di sekeliling disk optochin

Pada hasil tes fermentasi karbohidrat bakteri *Streptococcus mutans* menunjukkan reaksi terhadap karbohidrat jenis sorbitol, rhamnosa dan sukrosa dengan menunjukkan perubahan warna menjadi kuning. Karbohidrat yang tidak difermentasi berwarna tetap biru/kehijauan.



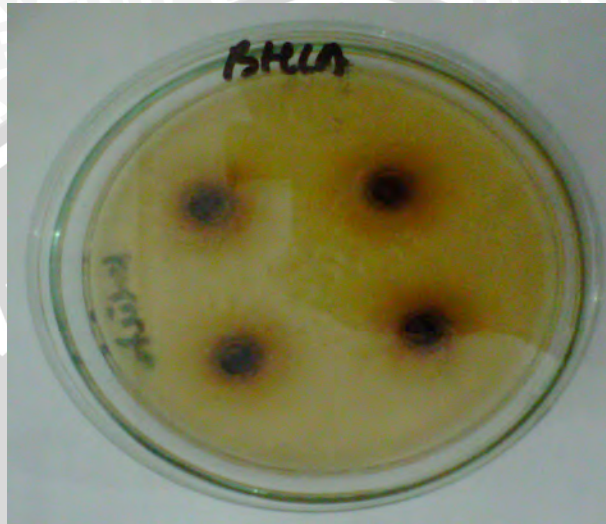
Gambar 5.4 Tes Fermentasi Karbohidrat Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*

Keterangan: A. Gelatin; B. Malorate; C. Inositol; D. Sorbitol; E. Rhamnosa; F. Sukrosa; G. Lactosa; H. Arabinosa; I. Adonitole; J. Rafinosa; K. Salicin; L. Arginin.

5.3 Hasil Pengamatan Uji Pendahuluan Metode Well-Difussion (Sumuran)

Dari hasil sumuran dapat terlihat zona hambat ekstrak etanol daun pandan wangi dari *Streptococcus mutans* walau tidak terlalu besar. Diameter zona hambat pada konsentrasi ekstrak 100% sebesar 20 mm dengan diameter

sumur sebesar 6 mm. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun pandan wangi memiliki daya hambat terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.



Gambar 5.5 Plate BHI yang Telah Digoreskan *Streptococcus mutans* dengan Sumuran Berisi Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi

5.4 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri dengan Penentuan nilai KHM

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk memperoleh rentang konsentrasi seminimal mungkin agar hasil yang diperoleh lebih teliti, rentang konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,56%. Hasil dari penelitian pendahuluan ini menunjukkan bahwa tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi ekstrak 25% atau konsentrasi akhir 12,5%. Oleh karena itu penelitian selanjutnya dilakukan dengan menggunakan enam macam konsentrasi ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), yaitu : 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%.

Tingkat kekeruhan larutan ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) diamati untuk menentukan KHM. Hasil uji dilusi tabung

dengan konsentrasi ekstrak 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30% disajikan pada

Gambar 5.6

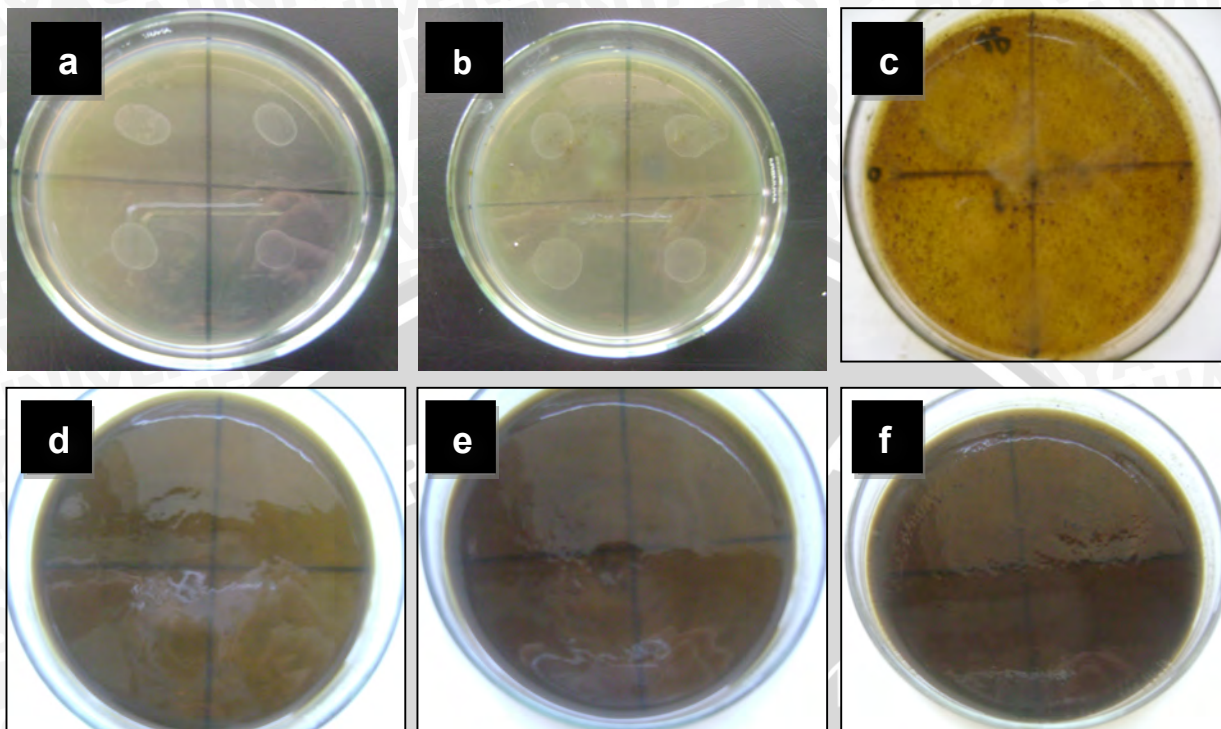


Gambar 5.6 Hubungan Peningkatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi dengan Tingkat kekeruhan

Keterangan:

- Campuran bakteri dan ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 5%
- Campuran bakteri dan ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 10%
- Campuran bakteri dan ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 15%
- Campuran bakteri dan ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 20%
- Campuran bakteri dan ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 25%
- Campuran bakteri dan ekstrak etanol daun pandan wangi konsentrasi 30%

Berdasarkan gambar di atas, perbedaan kekeruhan antar konsentrasi tidak dapat diamati karena semua warna tabung bersifat homogen dan berwarna gelap. Oleh karena itu, pengamatan langsung tingkat kekeruhan tiap konsentrasi secara visual tidak dapat ditentukan sehingga dilakukan penelitian dengan metode dilusi agar (Gambar 5.7).



Gambar 5.7 Hasil Uji Dilusi Agar dengan Berbagai Tingkat Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi

Keterangan:

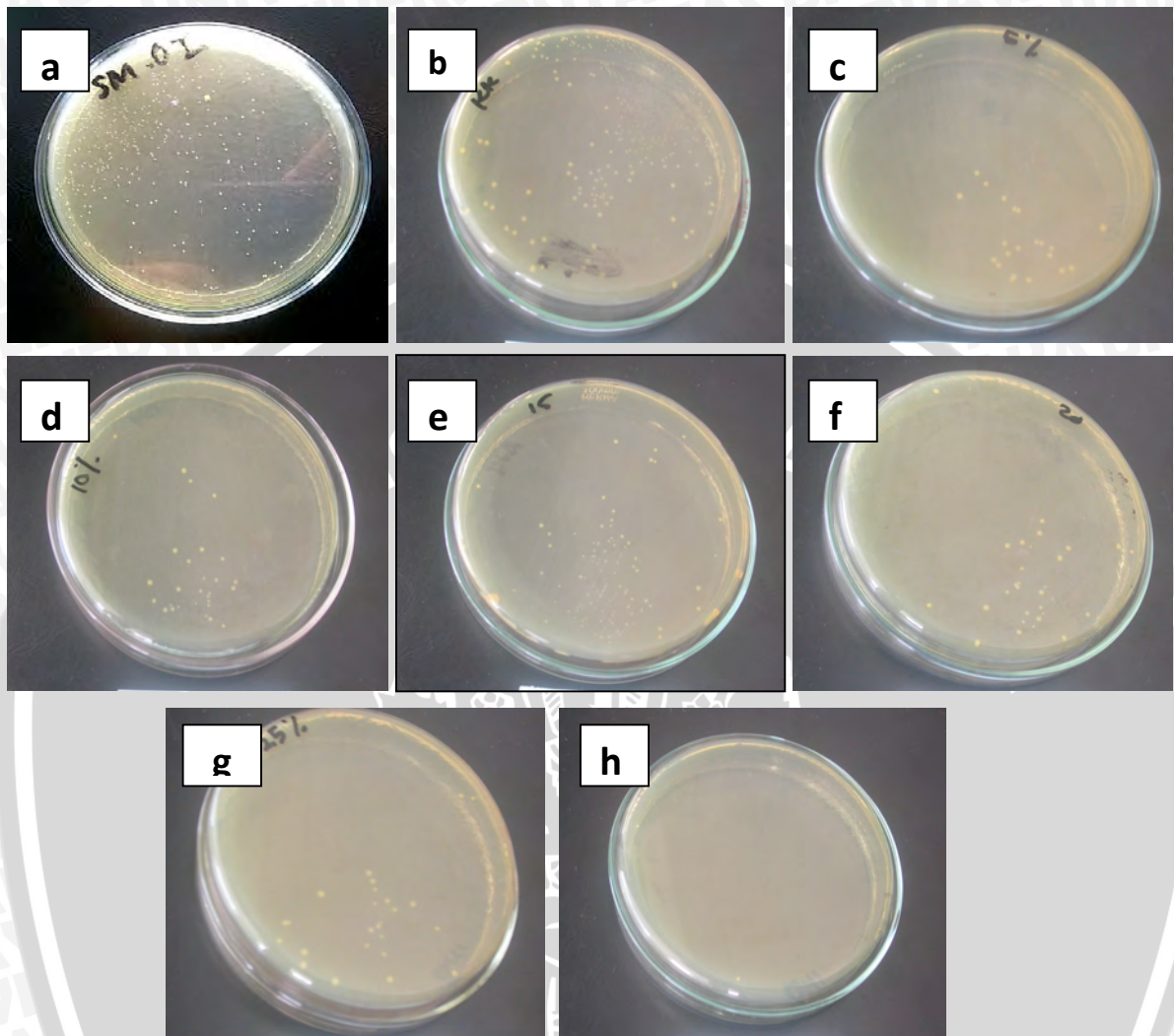
- a. Medium agar dengan konsentrasi ekstrak 0% atau kontrol positif
- b. Medium agar dengan konsentrasi ekstrak 5%
- c. Medium agar dengan konsentrasi ekstrak 10%
- d. Medium agar dengan konsentrasi ekstrak 15%
- e. Medium agar dengan konsentrasi ekstrak 20%
- f. Medium agar dengan konsentrasi ekstrak 25%

Berdasarkan Gambar 5.7, tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi ekstrak 10%, 15%, 20% dan 25%, sedangkan pada konsentrasi ekstrak 5% masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri. Oleh karena itu, nilai Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* ditetapkan pada konsentrasi ekstrak 10% v/v atau pada konsentrasi akhir 5% v/v.

5.5 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri dengan Penentuan Nilai KBM

Untuk menentukan nilai KBM, setiap konsentrasi ekstrak tersebut dilakukan penggoresan pada BHI agar. Kemudian, BHI agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Penghitungan jumlah koloni yang tumbuh pada masing-masing konsentrasi BHI agar dihitung keesokan harinya dengan menggunakan *colony counter* (Tabel 5.1). Hasil penggoresan pada BHI agar dapat dilihat pada Gambar 5.8.





Gambar 5.8 Pertumbuhan Koloni *Streptococcus mutans* pada BHI agar

Keterangan:

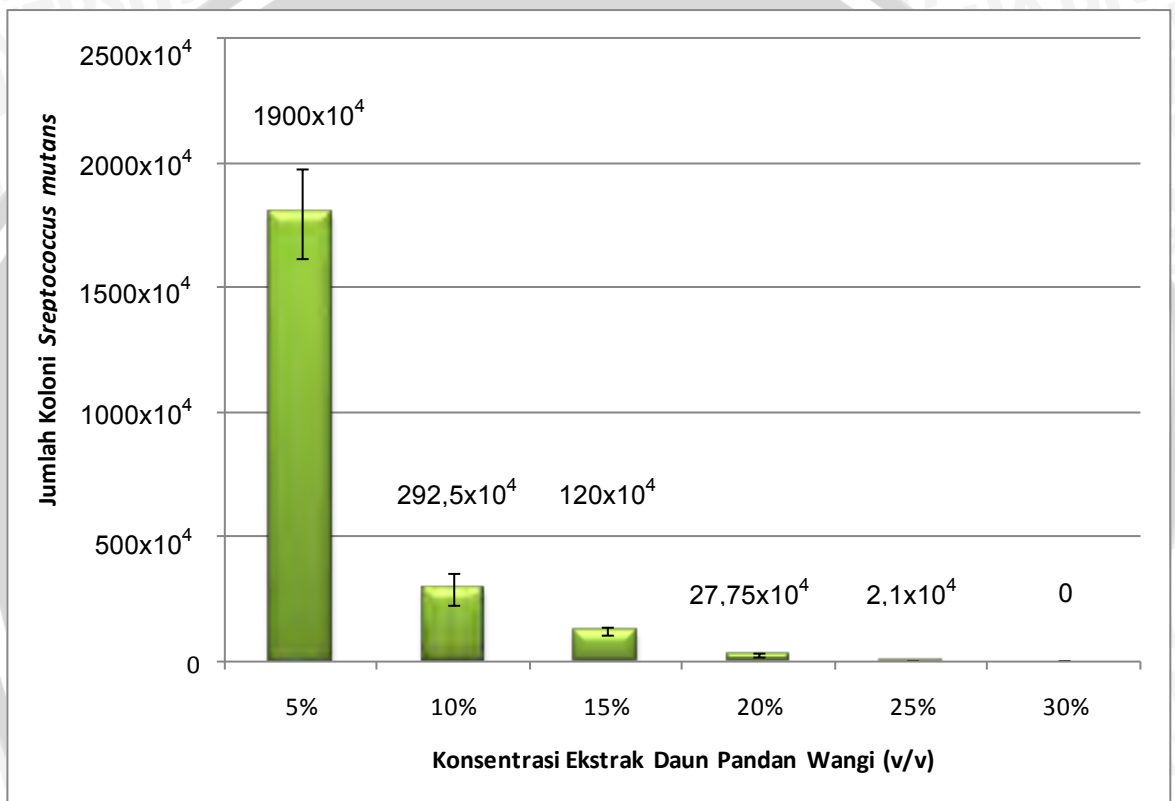
- a. Pertumbuhan koloni bakteri pada *Original Inoculum*
- b. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi akhir 0% atau kontrol bakteri atau kontrol positif.
- c. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi akhir 5%.
- d. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi akhir 10%.
- e. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi akhir 15%.
- f. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi akhir 20%.
- g. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi akhir 25%.
- h. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi akhir 30%.

Berdasarkan hasil penggoresan pada BHI agar dan penghitungan pada colony counter, terlihat pada gambar 5.5a rerata pertumbuhan *Streptococcus mutans* pada original inoculum adalah sebanyak 30×10^4 koloni. Penentuan kadar bunuh minimal dari ekstrak etanol daun pandan wangi adalah pertumbuhan koloni yang kurang dari 0,1% original inoculums yang artinya 0,1% dari 30×10^4 adalah 300. Nilai KBM ekstrak etanol daun pandan wangi adalah konsentrasi ekstrak 30% v/v atau pada konsentrasi akhir 15% v/v.

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Koloni Bakteri yang Tumbuh Pada BHI agar

Konsen- Trasi	Jumlah koloni (CFU/ml)				Rerata	Standar Deviasi
	I	II	III	IV		
OI	30×10^4	30×10^4	30×10^4	30×10^4	30×10^4	0
0%	$2.960.000 \times 10^4$	$2.960.000 \times 10^4$	$2.960.000 \times 10^4$	$2.960.000 \times 10^4$	$2.960.000 \times 10^4$	0
5%	2.000×10^4	1600×10^4	1700×10^4	2300×10^4	1900×10^4	1.825.742
10%	260×10^4	290×10^4	240×10^4	380×10^4	$292,5 \times 10^4$	618.465,8
15%	105×10^4	140×10^4	110×10^4	124×10^4	120×10^4	167.135,8
20%	21×10^4	26×10^4	35×10^4	29×10^4	$27,75 \times 10^4$	58.523,5
25%	2×10^4	$2,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	2.986,079
30%	0	0	0	0	0	0

Berdasarkan Tabel 5.1 dibuat grafik yang menunjukkan hubungan koloni yang tumbuh dengan berbagai konsentrasi ekstrak (Gambar 5.9). Dari gambar tersebut dapat diamati adanya penurunan jumlah koloni *Streptococcus mutans* yang tumbuh seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Rerata jumlah koloni juga semakin menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak.



Gambar 5.9 Grafik Hubungan Jumlah Koloni *Streptococcus mutans* dengan Konsentrasi Ekstrak Daun Pandan Wangi

5.6 Analisis Data

Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 19.0. Dalam perhitungan hasil penelitian ini menggunakan tingkat kepercayaan 95%. Syarat agar dapat menggunakan uji parametrik adalah data terdistribusi normal yang dibuktikan melalui uji normalitas di mana didapatkan nilai $p > 0,05$ (Sarwono, 2011).

Hasil uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* diperoleh nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) pada variabel jumlah bakteri, sedangkan pada variabel konsentrasi menunjukkan hasil 0,200. Hasil ini menunjukkan distribusi data tidak normal karena distribusi dianggap normal bila nilai signifikansi $> 0,05$ (Sarwono, 2011). Oleh karena itu dilakukan uji statistik non parametrik. Berdasarkan jumlah sampel yang lebih dari 10 maka uji non parametrik yang sesuai adalah uji *Kruskal Wallis* (Dahlan, 2001).

5.6.1 Analisis Data dengan Metode *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney*

Dari uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) menunjukkan minimal satu dari konsentrasi yang digunakan memberi perbedaan efek yang bermakna dengan konsentrasi yang lain.

Setelah dilakukan uji *Kruskal Wallis*, analisis dilanjutkan dengan menggunakan metode *Mann-Whitney*. Nilai signifikansi $< 0,05$ berarti pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna terhadap pertumbuhan bakteri (Tabel 5.2).

Dari hasil uji *Mann-Whitney*, diketahui bahwa antara konsentrasi 5% dan 10% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Dilanjutkan dengan konsentrasi 5% dan 15% nilai signifikansi yang didapat

0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 5% dan 20% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 5% dan 25% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 5% dan 30% nilai signifikansi yang didapat 0,014. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna.

Antara konsentrasi 10% dan 15% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 10% dan 20% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 10% dan 25% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 10% dan 30% nilai signifikansi yang didapat 0,014. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna .

Antara konsentrasi 15% dan 20% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 15% dan 25% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 15% dan 30% nilai signifikansi yang didapat 0,014. Hasil ini

menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna.

Antara konsentrasi 20% dan 25% nilai signifikansi yang didapat 0,021. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 20% dan 30% nilai signifikansi yang didapat 0,014. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna. Antara konsentrasi 25% dan 30% nilai signifikansi yang didapat 0,014. Hasil ini menunjukkan pemberian kedua konsentrasi tersebut memberikan perbedaan efek yang bermakna.

Tabel 5.2 Hasil Analisis Data dengan Metode Mann-Whitney

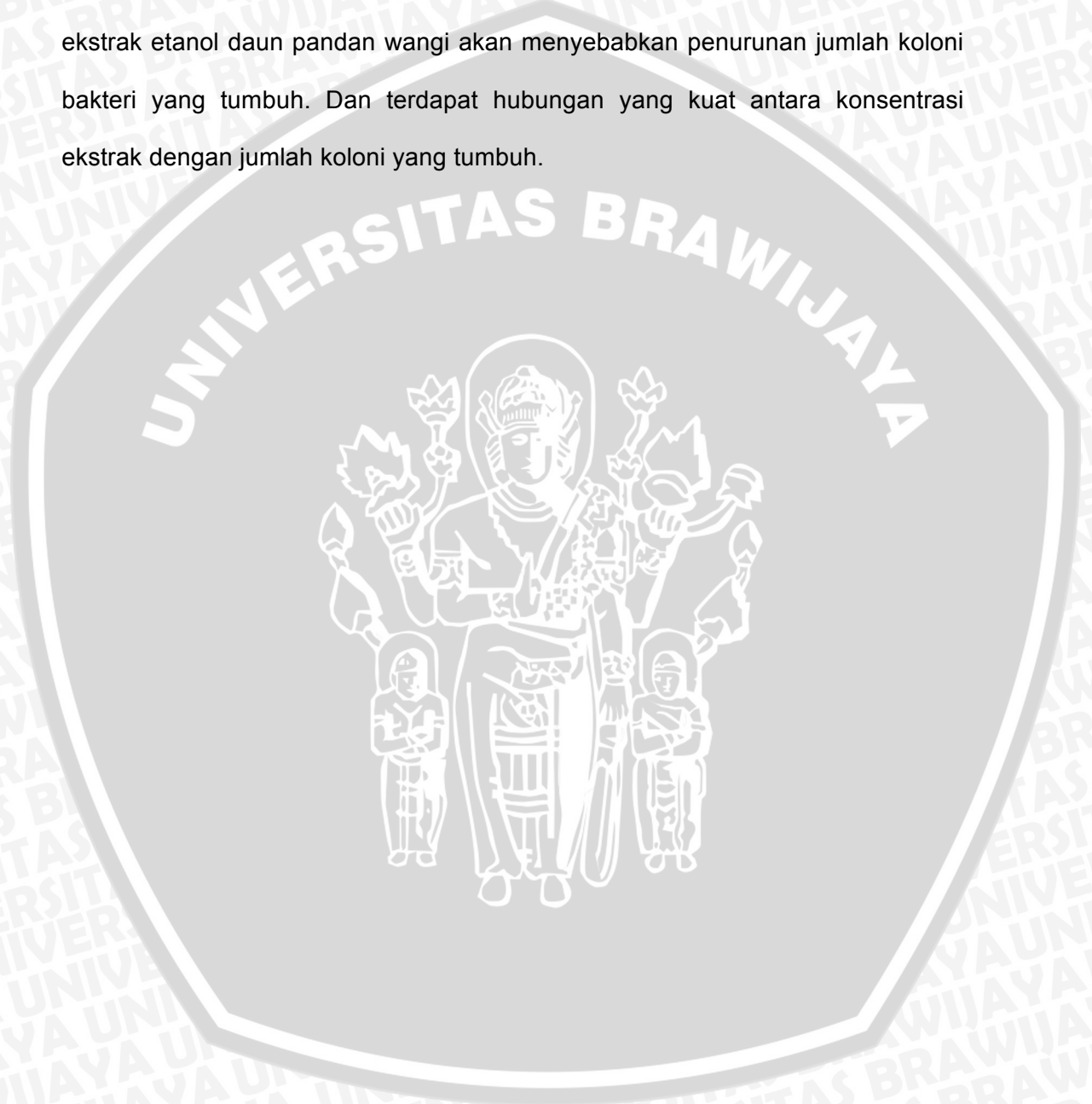
	5%	10%	15%	20%	25%	30%
5%	-	0,021 *	0,021 *	0,021 *	0,021 *	0.014 *
10%	0,021 *	-	0,021 *	0,021 *	0,021 *	0.014 *
15%	0,021 *	0,021 *	-	0,021 *	0,021 *	0.014 *
20%	0,021 *	0,021 *	0,021 *	-	0,021 *	0.014 *
25%	0,021 *	0,021 *	0,021 *	0,021 *	-	0.014 *
30%	0.014 *	0.014 *	0.014 *	0.014 *	0.014 *	-

Keterangan: * = terdapat perbedaan/bermakna

5.6.2 Analisis Data dengan Uji Korelasi Spearman

Setelah melakukan uji beda potensi diantara sampel, setelah itu dilakukan uji korelasi untuk menunjukkan ada tidaknya hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi dengan pertumbuhan koloni *Streptococcus mutans* serta seberapa kuat hubungan tersebut. Maka uji korelasi non-parametrik yang digunakan adalah uji korelasi *Spearman* karena dapat menganalisis distribusi data yang tidak normal.

Dari hasil uji korelasi didapatkan hasil signifikansi yang bermakna (0,00), serta koefisien korelasi yang besar dan berkebalikan (ditandai dengan tanda negatif). Hasil korelasi yang didapat yaitu -0,993. Hal ini berarti semakin tinggi ekstrak etanol daun pandan wangi akan menyebabkan penurunan jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Dan terdapat hubungan yang kuat antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni yang tumbuh.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental eksploratif laboratorik *in vitro* untuk mengetahui apakah ekstrak etanol daun pandan wangi memiliki efek antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Metode dilusi agar pada media BHI (*Brain Heart Infusion*) agar digunakan untuk penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM), serta metode dilusi tabung pada media BHI (*Brain Heart Infusion*) *brooth* untuk penentuan Kadar Bunuh Minimal (KBM) ditentukan dengan *streaking* hasil dilusi tabung pada plate BHI agar.

Penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) menggunakan metode dilusi agar, di mana setiap konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*) dicampurkan dengan medium *Brain Heart Infusion* (BHI) *Broth* yang masih cair, kemudian didinginkan hingga menjadi medium agar, lalu diberi 1 tetes suspensi bakteri (10 μ L) dengan kepadatan 10^4 CFU/ml dan dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37° C, diamati pertumbuhan bakteri yang terjadi. Penentuan KHM berdasarkan pada tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media BHI agar.

KBM (Kadar Bunuh Minimal) adalah kadar terendah dari antibakteri yang dapat membunuh bakteri (ditandai dengan tidak tumbuhnya bakteri pada BHI agar) atau pertumbuhan koloni kurang dari 0,1% dari jumlah koloni inokulum awal (*original inoculum/OI*) pada media agar BHI yang telah dilakukan penggosokan sebanyak satu ose.

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri *Streptococcus mutans* diidentifikasi terlebih dahulu dengan beberapa tes, yaitu pengecatan Gram yang menunjukkan warna ungu (yang menunjukkan bakteri gram positif) karena kemampuan untuk menyerap dan mempertahankan warna kristal violet yang ditetaskan. Morfologi bakteri berbentuk kokus yang berantai. Kemudian tes katalase dimana *Streptococcus mutans* tidak menimbulkan gelembung udara yang menunjukkan tidak adanya reaksi dengan hidrogen peroksida. Bila hasil katalase positif, yaitu tampak gelembung udara, maka bakteri tersebut merupakan jenis *Staphylococcus*. Kemudian dilakukan tes antibiotik *optochin*, pada tes *optochin* *Streptococcus mutans* menunjukkan reaksi yang kurang sensitif. Hasil ini ditunjukkan dengan zona hambatan <14mm di sekeliling disk *optochin*. Tes ini digunakan untuk membedakan bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang peka terhadap *optochin* dan bakteri *Streptococcus mutans* yang resisten terhadap *optochin*. Setelah itu dilakukan tes fermentasi karbohidrat yang menunjukkan karbohidrat yang dapat difermentasi oleh *Streptococcus mutans* adalah sukrosa, rhamnose dan sorbitol. Dari jenis karbohidrat tersebut, terutama sukrosa, terdapat pada bahan makanan dan dapat difermentasikan sehingga menghasilkan asam yang mengarah pada penyakit karies gigi. *Streptococcus mutans* dapat memfermentasikan jumlah sukrosa yang tertinggi diantara jenis streptococcus lain. Dengan melihat hasil dari beberapa jenis identifikasi ini, dapat membuktikan bahwa bakteri yang diteliti tersebut memang benar *Streptococcus mutans*.

Daun pandan wangi yang digunakan diperoleh dari pemetikan tanaman di daerah Malang. Daun pandan wangi tersebut kemudian digiling halus agar memudahkan bahan aktif untuk terekstrak lebih sempurna. Teknik ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol 96% karena dapat menarik bahan aktif daun pandan wangi yaitu alkaloid, saponin, flavonoida, tanin, dan polifenol.

Ekstrak etanol daun pandan wangi berwarna hitam. Ekstrak daun pandan wangi berbentuk cair dan jika dicampur dengan aquades larutan tersebut menjadi homogen dengan warna hitam kecoklatan. Apabila larutan tersebut dicampurkan dengan *Brain Heart Infusion* (BHI) *Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C akan terdapat larutan homogen berwarna hitam kecoklatan pada hasil medium.

Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi dari ekstrak etanol daun pandan wangi yaitu 5% ; 10% ; 15% ; 20% ; 25% ; 30%. Dipilih rentang konsentrasi ekstrak 5 karena jarak tersebut tidak terlalu jauh dan meminimalkan kesalahan dalam pengukuran ekstrak. Karena bila rentang konsentrasi terlalu rapat, misal 0,5 atau 1, maka tingkat kesalahan pengambilan ekstrak akan semakin besar disamping kemungkinan efek ekstrak yang terlihat tidak terlalu berbeda. Konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi tersebut merupakan hasil eksplorasi yang dilakukan berulang kali sebelum penelitian ini dilakukan. Metode awal yang digunakan dalam eksplorasi adalah difusi cakram di mana tampak zona hambat yang menunjukkan ekstrak etanol daun pandan wangi memiliki efek antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. Kemudian dilanjutkan pengenceran bertingkat yang bertujuan untuk mempermudah menemukan kira-

kira jarak konsentrasi yang paling tepat untuk melakukan eksplorasi lanjutan hingga ditemukannya konsentrasi di atas.

Pada penelitian ini digunakan kontrol bahan dan kontrol bakteri pada uji dilusi tabung dan dilanjutkan dengan dilusi agar untuk menentukan KHM. Serta dilakukan pengamatan jumlah koloni bakteri pada medium BHI agar untuk menentukan KBM. Tujuan digunakannya kontrol bahan dan kontrol bakteri ini adalah sebagai alat pembanding perlakuan bahan uji terhadap bakteri uji. Kontrol bahan dan kontrol bakteri diuji di tabung dan digoreskan pada BHI. Kontrol bahan menunjukkan hasil tidak didapatkan bakteri pada plate BHI sedangkan pada kontrol bakteri terdapat ribuan koloni bakteri pada BHI. Sehingga jika dihitung dengan pengenceran 5x mendapatkan hasil 29.600.000 koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Jika kadar perlakuan keadaannya sama dengan kontrol bahan, maka dapat dikatakan bahwa pada dosis tersebut mempunyai efek menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji, sebaliknya jika kadar perlakuan keadaannya sama dengan kontrol bakteri maka kadar tersebut tidak mempunyai efek menghambat atau membunuh bakteri uji.

Penentuan KHM dilakukan dengan cara melihat konsentrasi minimal ekstrak etanol daun pandan wangi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji yang ditandai dengan tidak ada kekeruhan pada bahan uji dalam BHI *broth* yang telah diberi bakteri uji tersebut setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Kejernihan larutan ekstrak etanol daun pandan wangi tidak dapat dikonfirmasi dengan cara melihat kekeruhan pada tabung, sehingga dilakukan metode dilusi agar untuk menentukan nilai KHM. Hasil pada BHI agar menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak 15%, 20%, 25% dan 30% tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri. Sedangkan konsentrasi ekstrak 5% masih terdapat pertumbuhan koloni

bakteri. Oleh karena itu, ditetapkan bahwa nilai Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* adalah konsentrasi ekstrak 10% atau pada konsentrasi akhir 5% v/v.

Penetapan KBM dilakukan dengan cara mengambil satu ose dari setiap tabung dengan konsentrasi yang telah ditetapkan dan ditanamkan pada media BHI agar kemudian diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada agar BHI diamati dengan seksama dan diperoleh KBM ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap bakteri *Streptococcus mutans* pada konsentrasi ekstrak 30% atau pada konsentrasi akhir 15%. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada konsentrasi akhir 15%, di mana keadaan ini sama dengan keadaan pada kontrol negatif. Artinya telah didapatkan konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi yang memiliki daya bunuh minimal terhadap *Streptococcus mutans* pada konsentrasi akhir 15%, karena pada konsentrasi diatas akhir 15% plate BHI sama sekali tidak ada pertumbuhan bakteri, sedangkan pada plate BHI konsentrasi akhir 12,5% pertumbuhan bakteri masih melebihi 0,1% dari *Original Inoculum*.

Jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung setelah penentuan KBM dengan menggunakan *colony counter*. Jumlah koloni yang sudah dihitung dianalisa dahulu dengan uji normalitas baik variabel jumlah koloni bakteri maupun konsentrasi ekstrak daun pandan wangi. Syarat distribusi normal pada uji normalitas adalah kedua variabel memiliki nilai $p > 0,05$ (Sarwono, 2011). Dari hasil analisa dengan SPSS, didapatkan nilai signifikansi uji normalitas variabel konsentrasi adalah 0,200 yang berarti distribusi normal. Sedangkan nilai signifikansi variabel jumlah bakteri adalah 0,000 yang berarti tidak berdistribusi

normal. Distribusi yang tidak normal ini dapat diakibatkan oleh rentang jumlah bakteri yang terlalu jauh antara konsentrasi ekstrak 5% (19.000 koloni), konsentrasi ekstrak 10% (2925 koloni), konsentrasi ekstrak 15% (1200 koloni), konsentrasi ekstrak 20% (278 koloni), begitu juga konsentrasi ekstrak 25% (22 koloni) sehingga dalam perhitungan analisis hal ini dibaca sebagai distribusi yang tidak merata. Sedangkan pada variabel konsentrasi, jarak antar konsentrasi akhir 2,5 dibaca sebagai distribusi yang normal dan merata.

Hasil distribusi data yang tidak normal ini kemudian dicoba ditransformasikan untuk menormalkan data tanpa mengubah data yang ada, namun setelah ditransformasi, hasil uji homogenitas masih belum mencapai hasil yang normal, sehingga analisa menggunakan statistik parametrik tidak dapat dilakukan karena tidak memenuhi syarat normalitas dan homogenitas. Maka dilakukan analisa dengan statistik non parametrik. Untuk melihat ada tidaknya perbedaan antara beberapa konsentrasi ekstrak yang diberikan dengan jumlah bakteri berdasarkan jumlah sampel yang lebih dari 10 maka uji non parametrik yang sesuai adalah uji *Kruskal Wallis*. Syarat dari uji ini adalah nilai signifikansi $<0,05$ menunjukkan ada perbedaan (Sarwono, 2011). Hasil analisa SPSS, hasil signifikansi *Kruskal-Wallis* yang didapat adalah 0,000 yang berarti pemberian beberapa konsentrasi ekstrak menunjukkan perbedaan dalam perubahan jumlah bakteri *Streptococcus mutans*.

Setelah mengetahui bahwa ada perbedaan pemberian beberapa konsentrasi ekstrak dengan perubahan jumlah bakteri, maka uji selanjutnya adalah uji korelatif untuk mengetahui seberapa besar hubungan/korelasi dari perbedaan konsentrasi ekstrak yang diberikan dengan pertumbuhan koloni bakteri. Uji korelasi non parametrik yang digunakan adalah uji *Spearman*.

Signifikansi yang didapat adalah 0,00 yang menunjukkan bahwa korelasi antara konsentrasi ekstrak yang diberikan dengan jumlah koloni bakteri bermakna dan layak untuk dibaca. Nilai korelasi *Spearman* yang didapat adalah -0,993. Tanda negatif menunjukkan bahwa korelasi bersifat berbanding terbalik antara konsentrasi ekstrak dengan pertumbuhan koloni bakteri, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri yang tumbuh, sedangkan angka 0,993 menunjukkan kekuatan korelasi sangat kuat karena mendekati angka satu. Ini berarti ekstrak etanol daun pandan wangi mempunyai efek anti bakteri yang kuat terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

Sehingga selanjutnya, dilakukan komparasi menggunakan uji *Mann-Whitney*. Untuk membandingkan perbedaan antara pemberian dua konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi. Syarat dari uji *Mann-Whitney* yaitu nilai $p < 0,05$ sehingga hasilnya dinyatakan sebagai H_1 dimana terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok bakteri yang diberi ekstrak dengan konsentrasi berbeda. Dari hasil komparasi, semua ekstrak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini disebabkan karena perbedaan jumlah bakteri yang rentangnya cukup besar antar konsentrasi ekstrak.

Dari hasil penelitian dapat ditentukan KHM dan KBM ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap *Streptococcus mutans* serta diperkuat dengan hasil analisa statistik non parametrik yang mempunyai nilai kemaknaan yang tinggi, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun pandan wangi menghambat atau membunuh *Streptococcus mutans* secara *in-vitro*. Bila dihubungkan dengan hipotesis yang telah disusun pada awal penelitian, yaitu ekstrak etanol daun

pandan wangi menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri *Streptococcus mutans*, maka hipotesis dapat diterima.

Aplikasi klinis ekstrak etanol daun pandan wangi sebagai antimikroba masih memerlukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo*, walaupun secara *in vitro* efeknya sudah terbukti. Hal ini dikarenakan secara medis belum ada penelitian mengenai dosis efektif, toksisitas dan efek samping yang mungkin ditimbulkan ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap tubuh manusia. Dari sini perlu dilakukan penelitian *in vivo* terhadap hal-hal yang belum diketahui dari efek ekstrak etanol daun pandan wangi yang dilakukan pada hewan coba terlebih dahulu, apabila hasil penelitian pada hewan coba menghasilkan preparat yang bagus dan tidak memiliki efek samping serta toksisitas yang buruk, maka penelitian *in vivo* menggunakan ekstrak etanol daun pandan wangi ini kemudian dapat diuji pada manusia sehingga diharapkan dapat menjadi alternatif preventif karies gigi yang murah, efektif dan minim efek samping.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun pandan wangi menghambat dan membunuh pertumbuhan atau mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* secara *in-vitro* yang dibuktikan dengan:

- 7.1.1 Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin rendah jumlah koloni bakteri yang tumbuh
- 7.1.2 Nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol daun pandan wangi terhadap bakteri *Streptococcus mutans* adalah pada konsentrasi akhir 5% dan 15%.

7.2 Saran

Dengan mempertimbangkan kekurangan pada penelitian ini, maka perlu diadakan penelitian yang lebih lanjut dengan memperhatikan:

- Efek antimikroba ekstrak etanol daun pandan wangi secara *in-vivo* untuk melihat farmakodinamik, farmakokinetik dan toksisitas dari bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun pandan wangi.
- Efek ekstrak etanol daun pandan wangi dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri lain selain *Streptococcus mutans*, untuk mengetahui bagaimana pengaruh ekstrak daun pandan wangi terhadap flora normal dalam rongga mulut.

- Penelitian lanjutan dengan menggunakan rentang konsentrasi ekstrak etanol daun pandan wangi yang lebih kecil.
- Penelitian lanjutan menggunakan cara mengekstrak flavonoid yang lebih spesifik selain dengan metode maserasi etanol.



DAFTAR PUSTAKA

- Baum, L., Phillips, R., Lund, M. 1997. *Buku Ajar Ilmu Konservasi Gigi (Textbook of Operative Dentistry)*. Edisi III, EGC, Jakarta, hal. 14 – 15.
- Cowan, MM. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. <http://pubmedcentral.nih.gov>. Diakses tanggal 10 Oktober 2011.
- Cawson, R.A., Odel, E.W. 2002. *Cawson's Essentials of Oral Pathology and Oral Medicine*. Philadelphia : Elsevier.
- Dahlan, S M. 2001. *Statistika untuk kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: PT Arkans. Halaman 56, 59.
- Dede S, Sandra H, Emi L. 2007. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pandan Wangi (*pandanus amaryllifous* Roxb.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). (online). (<http://jurnal.pdii.lipi.go.id/admin/jurnal/12086168.pdf>, diakses tanggal 15 November 2011).
- Dede S, Sandra H, Emi L. 2007. Uji Potensi Aktivitas Anti Kanker Ekstrak Daun Pandan Wangi (*pandanus amaryllifolius* Roxb.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). (online). (<http://isjd.pdii.lipi.go.id/admin/jurnal/111093238.pdf>, diakses tanggal 14 November 2011).
- Dorland. 1998. *Kamus Saku Kedokteran Dorland*, EGC, Jakarta, hal. 56, 93, 137.
- Dzen, S M.; Roekistiningsih; Santoso, S; Winarsih, S. 2006. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Kedokteran*. Malang : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Farida J R, Dewa A C M, Bunga N, Titis N, Endrawati T B. 2008. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. (online). (http://fisika.ub.ac.id/bss-ub/PDF%20FILES/BSS_205_1.pdf, diakses pada 1 November 2011).
- Forssten, S; Bjorklund, Marika; Ouwehand, Arthur. 2010. Streptococcus mutans, Caries and Simulation Model. *Nutrients Journal*, 2010, 2, 290-298. Finland.
- Finegold, S. M., Martin, W. J., Scoth, E. G. 2007. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. St. Louis: C.V. Mosby. P. 176, 385, 389-391, 396.

- Hartati, I. 2010. *Isolasi Alkaloid Dari Tepung Gadung (Dioscorea hispida Dennst) Dengan Teknik Ekstraksi Berbantu Gelomvang Mikro*. Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro, Semarang.
- Harty, F.J., Ogston, R. 1995. *Kamus Kedokteran Gigi*, EGC, Jakarta, hal. 56, 93, 137.
- Inne S.S dan Arlette S.P.P. 2007. Identifikasi, Pencegahan, dan Restorasi sebagai Penatalaksanaan Karies Gigi pada Anak. (online). (http://resources.unpad.ac.id/unpad-content/uploads/publikasi_dosen/identifikasi%20pencegahan%20karies.pdf, diakses tanggal 2 November 2011).
- Kidd, E.A.M. dan Bechal S.J. 1992. *Dasar-dasar Karies Penyakit dan Penanggulangannya*, EGC, Jakarta, hal.15 – 17.
- Lukito, H.H. 1998. *Rancangan Percobaan Suatu Pengantar*. IKIP, Malang.
- Nugraha, A W. 2007. Streptococcus mutans Si Plak Dimana-mana. (online). (http://usupress.usu.ac.id/files/Menuju%20Gigi%20dan%20Mulut%20Sehat%20Pencegahan%20dan%20Pemeliharaan%20Normal_bab%201.pdf, diakses tanggal 2 November 2011).
- Pickard, H.M dan Kidd, E.A.M. 2002. *Manual Konservasi Restoratif Menurut Pickard*, Widya Medika, Jakarta, hal. 3 – 17.
- Pratiwi, R. 2005. *Perbedaan Daya Hambat Terhadap Streptococcus mutans dari Beberapa Pasta Gigi yang Mengandung Herbal*. (online). (<http://Jurnal.unair.ac.id/filerPDF/DENTJ-38-2-05.pdf>, diakses tanggal 2 November 2011).
- Putri, Z F. 2010. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih (piper betle l.) Terhadap Propionibacterium acne dan staphylococcus aureus Multiresisten*. Tugas Akhir. Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Samaranayake, L. 2007. *Essential Microbiology for Dentistry*. Philadelphia : Elsevier. P. 269 – 270.
- Sarwono, J. 2011. *Buku Pintar IBM SPSS Statistics 19: Cara Operasi, Prosedur Analisis Data dan Interpretasi*, PT Elex Media Komputindo, Jakarta, hal. 157, 168,196, 236, 242.
- Rahayu S. E. dan Handayani S. 2008. *Keanekaragaman Morfologi dan Anatomi Pandanus (Pandanaaceae) di Jawa Barat*. (online). (http://biologi.unas.ac.id:8080/web_biologi/publikasi/Pandanus.pdf, diakses tanggal 15 November 2011).

Setyorini, H E. 2011. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (pandanus ammaryllifolius Roxb.) terhadap Propionibacterium acnes dan Pseudomonas aeruginosa Serta Skrining Fitokimia.* (online). (http://etd.eprints.ums.ac.id/15017/3/BAB_1.pdf, diakses tanggal 15 November 2011).



Lampiran 1. Uji Normalitas

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
konsentrasi	.123	28	.200 [*]	.922	28	.039
jumlah	.512	28	.000	.420	28	.000

a. Lilliefors Significance Correction

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



Lampiran 2. Uji Kruskal Wallis

Ranks			
	kons1	N	Mean Rank
jumlah	1.00	4	26.50
	2.00	4	22.50
	3.00	4	18.50
	4.00	4	14.50
	5.00	4	10.50
	6.00	4	6.50
	7.00	4	2.50
	Total	28	

Test Statistics ^{a,b}	
	jumlah
Chi-Square	26.629
df	6
Asymp. Sig.	.000
a. Kruskal Wallis Test	
b. Grouping Variable: kons1	

Lampiran 3. Uji Korelasi Spearman

Correlations				
			jumlah	kons1
Spearman's rho	jumlah	Correlation Coefficient	1.000	-.993**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	28	28
	kons1	Correlation Coefficient	-.993**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	28	28
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).				

Lampiran 4. Uji Mann-Whitney

Mann-Whitney TestRanks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	.00	4	6.50	26.00
	5.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	.00	4	6.50	26.00



	10.00	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics ^b	
	Jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	.00	4	6.50	26.00
	15.00	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics ^b	
	jumlah



Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: konsentrasi	

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	.00	4	6.50	26.00
	20.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a



a. Not corrected for ties.
 b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	.00	4	6.50	26.00
	25.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.
 b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks



jumlah	.00	4	6.50	26.00
	30.00	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	5.00	4	6.50	26.00
	10.00	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics ^b	
	jumlah

Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: konsentrasi	

Mann-Whitney TestRanks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	5.00	4	6.50	26.00
	15.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	Jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: konsentrasi	



Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	5.00	4	6.50	26.00
	20.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Mann-Whitney TestRanks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	5.00	4	6.50	26.00
	25.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	5.00	4	6.50	26.00
	30.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460

Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: konsentrasi	

Mann-Whitney TesRanks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	10.00	4	6.50	26.00
	15.00	4	2.50	10.00
	Total	8		
Test Statistics ^b				
		Jumlah		
Mann-Whitney U		.000		
Wilcoxon W		10.000		
Z		-2.309		
Asymp. Sig. (2-tailed)		.021		
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.029 ^a		
a. Not corrected for ties.				
b. Grouping Variable: konsentrasi				

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	10.00	4	6.50	26.00
	20.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Mann-Whitney TestRanks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	10.00	4	6.50	26.00
	25.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	Jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: konsentrasi	

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	10.00	4	6.50	26.00
	30.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: konsentrasi	

Mann-Whitney TestRanks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	15.00	4	6.50	26.00
	20.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: konsentrasi	



Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	15.00	4	6.50	26.00
	25.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Mann-Whitney TestRanks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	15.00	4	6.50	26.00
	30.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
------------------------------	--



	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	20.00	4	6.50	26.00
	25.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	20.00	4	6.50	26.00
	30.00	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi

Ranks				
	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
jumlah	25.00	4	6.50	26.00
	30.00	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics ^b	
	jumlah
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: konsentrasi



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Kalistha Primivanny Harsono

NIM : 0910740038

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter Gigi

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 dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa tugas akhir ini adalah jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 23 Januari 2013

Kalistha Primivanny Harsono

NIM. 0910740038