

**EFEK ANTIMIKROBA EKSTRAK KELOPAK BUNGA ROSELLA (*Hibiscus
sabdariffa* L.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Corynebacterium
diphtheriae* DAN *Corynebacterium striatum* SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh

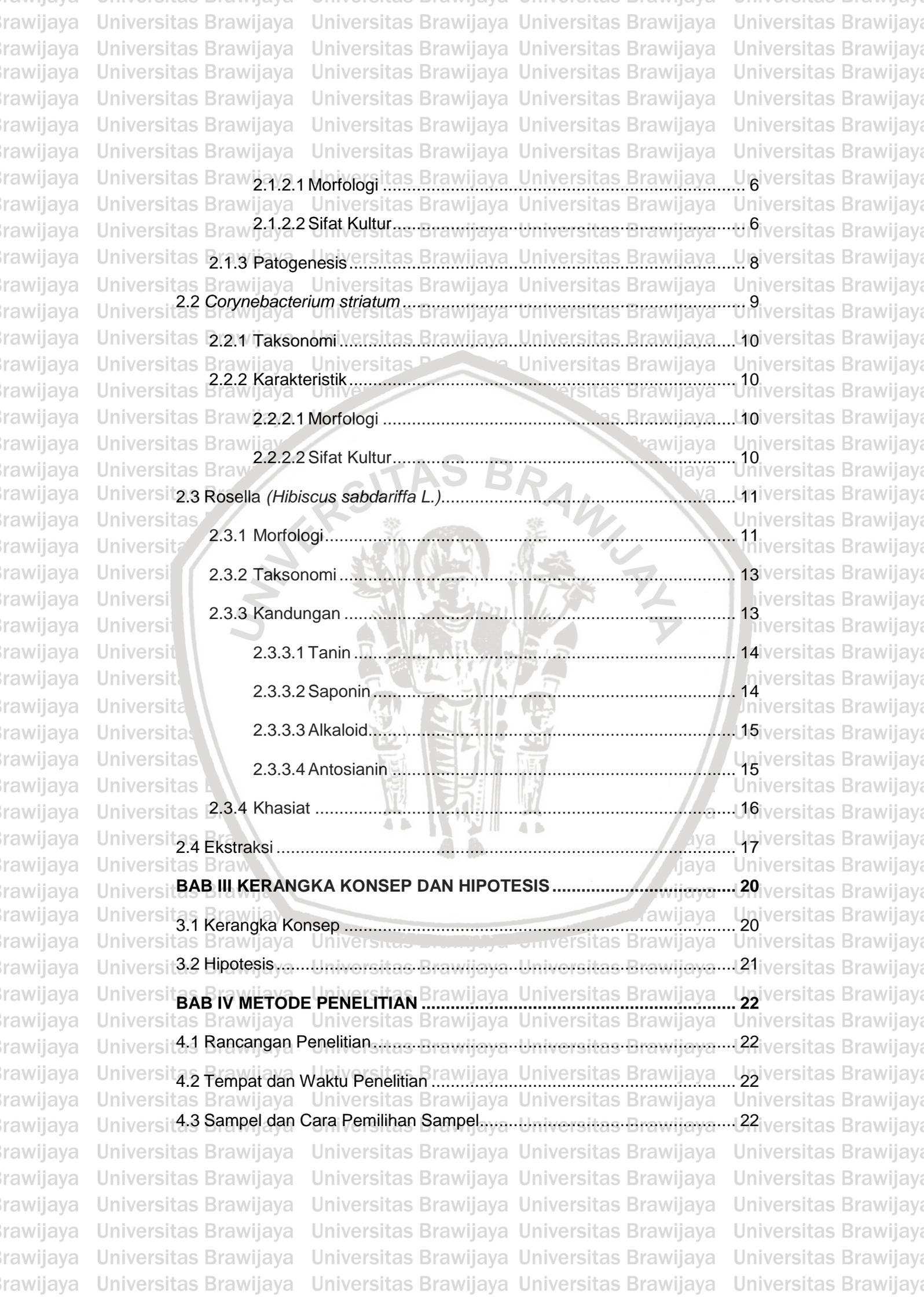
**Nadia Annizar
NIM 155070101111062**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018

DAFTAR ISI

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



2.1.2.1 Morfologi	6
2.1.2.2 Sifat Kultur	6
2.1.3 Patogenesis	8
2.2 <i>Corynebacterium striatum</i>	9
2.2.1 Taksonomi	10
2.2.2 Karakteristik	10
2.2.2.1 Morfologi	10
2.2.2.2 Sifat Kultur	10
2.3 Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	11
2.3.1 Morfologi	11
2.3.2 Taksonomi	13
2.3.3 Kandungan	13
2.3.3.1 Tanin	14
2.3.3.2 Saponin	14
2.3.3.3 Alkaloid	15
2.3.3.4 Antosianin	15
2.3.4 Khasiat	16
2.4 Ekstraksi	17

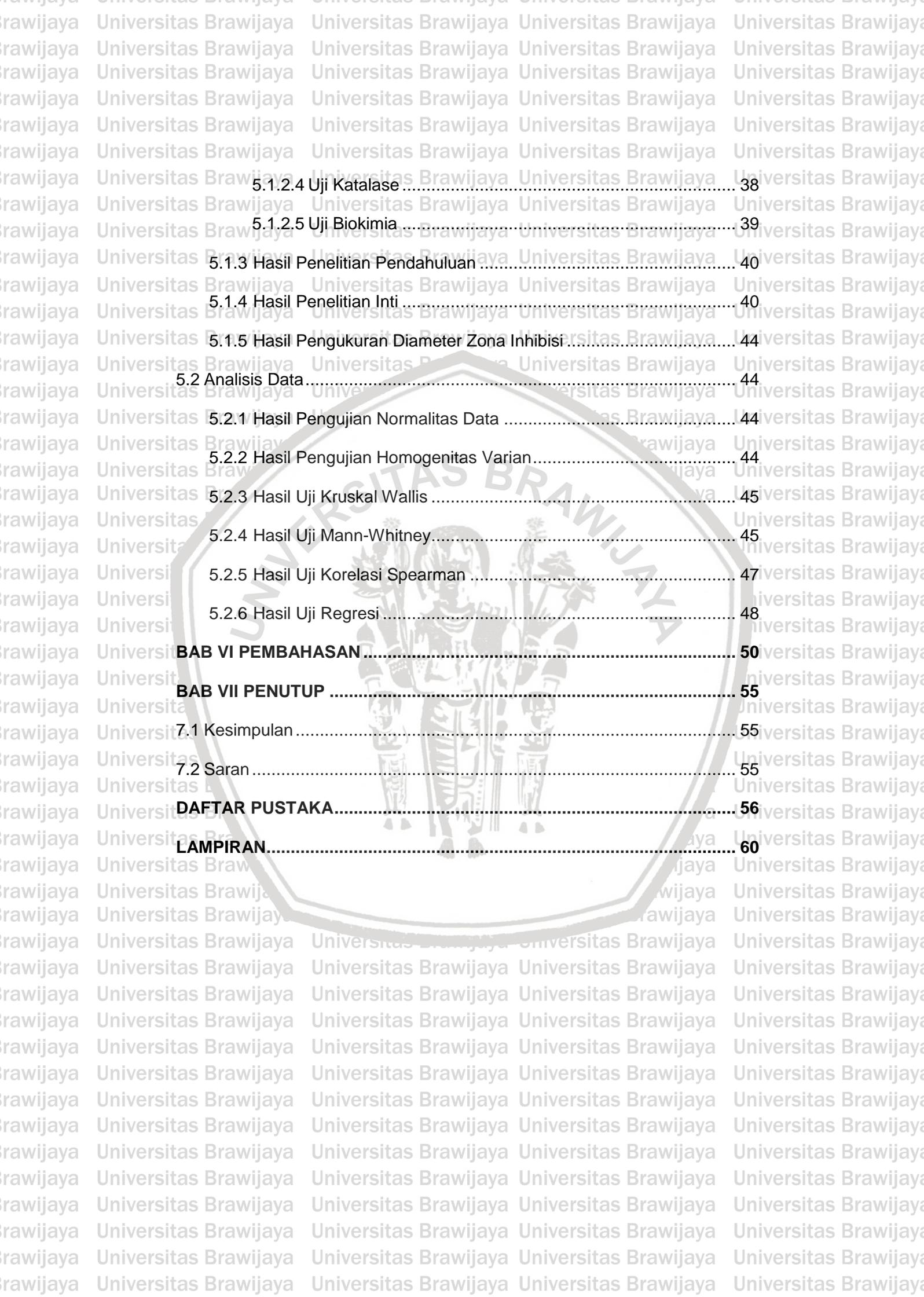
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS 20

3.1 Kerangka Konsep	20
3.2 Hipotesis	21

BAB IV METODE PENELITIAN 22

4.1 Rancangan Penelitian	22
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	22
4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel	22

4.4 Variabel Penelitian.....	23
4.4.1 Variabel Independen.....	23
4.4.2 Variabel Dependen.....	24
4.5 Definisi Operasional.....	24
4.6 Prosedur Penelitian.....	25
4.6.1 Persiapan Kelopak Bunga Rosella.....	25
4.6.2 Preparasi Bakteri.....	27
4.6.2.1 Tes Identifikasi.....	27
4.6.2.1.1 Pewarnaan Gram.....	27
4.6.2.1.2 Pewarnaan Neisser.....	28
4.6.2.1.3 Tes Katalase.....	28
4.6.2.1.4 Uji Biokimia.....	29
4.6.2.1.5 CTBA.....	30
4.6.2.2 Pembuatan Suspensi Uji Bakteri.....	30
4.6.3 Pembuatan Medium.....	31
4.6.4 Pengujian Efek Antimikroba.....	32
4.7 Analisis Data.....	33
4.8 Rancangan Operasional.....	35
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	36
5.1 Hasil Penelitian.....	36
5.1.1 Hasil Ekstraksi.....	36
5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri.....	36
5.1.2.1 Kultur BTA.....	37
5.1.2.2 Pewarnaan Gram.....	37
5.1.2.3 Pewarnaan Neisser.....	38



5.1.2.4 Uji Katalase	38
5.1.2.5 Uji Biokimia	39
5.1.3 Hasil Penelitian Pendahuluan	40
5.1.4 Hasil Penelitian Inti	40
5.1.5 Hasil Pengukuran Diameter Zona Inhibisi	44
5.2 Analisis Data	44
5.2.1 Hasil Pengujian Normalitas Data	44
5.2.2 Hasil Pengujian Homogenitas Varian	44
5.2.3 Hasil Uji Kruskal Wallis	45
5.2.4 Hasil Uji Mann-Whitney	45
5.2.5 Hasil Uji Korelasi Spearman	47
5.2.6 Hasil Uji Regresi	48
BAB VI PEMBAHASAN	50
BAB VII PENUTUP	55
7.1 Kesimpulan	55
7.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	60

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK ANTIMIKROBA EKSTRAK KELOPAK BUNGA ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa* L.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Corynebacterium diphtheriae* DAN *Corynebacterium striatum* SECARA IN VITRO

Oleh:

Nadia Annizar

NIM 155070101111062

Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 14 November 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

dr. Onggung MH Napitupulu, M.Kes

NIP.194901231980031001

Pembimbing-I/Penguji-II,

Pembimbing-II/Penguji-III,

dr. Yuanita Mulyastuti, M.Sr
NIP. 198208092009122004

dr. Dearkha Karina M. M.Biomed
NIK. 2012018812042001



Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran,

dr. Priwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)

NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Annizar, Nadia. 2018. “Efek Antimikroba Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* secara *In Vitro*”. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Yuanita Mulyastuti, M.Si, (2) dr. Dearikha Mayashinta, M.Biomed.

Bakteri *Corynebacterium* sp. kini semakin dikenal sebagai penyebab penyakit. Patogen yang paling signifikan dari kelompok ini adalah *C. diphtheriae* yang berperan sebagai penyebab utama difteri dan juga *C. striatum* yang potensial terhadap penyakit nosokomial dan respirasi. *C. diphtheriae* dan juga *C. striatum* menunjukkan resistensi terhadap terapi obat antimikroba penicillin G, erithromycin, azithromycin, levofloxacin, dan ciprofloxacin. Berdasarkan alasan tersebut, diperlukan bahan alternatif sebagai antimikroba yang poten menghambat pertumbuhan bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum*. Salah satu cara untuk menghambat pertumbuhan bakteri *C. Diphtheriae* dan *C. striatum* yaitu dengan penggunaan bahan aktif tanin, alkaloid, saponin dan antosianin yang terkandung dalam kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* dengan menggunakan desain eksperimental di laboratorium melalui uji potensi antimikroba metode difusi sumuran. Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada penelitian ini adalah 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dengan lima kali pengulangan. Hasil penelitian menunjukkan zona hambat yang berbeda pada setiap kenaikan konsentrasi. Analisis statistis menggunakan *Kruskal Wallis* menunjukkan perbedaan zona hambat *C. diphtheriae* dan *C. striatum* yang signifikan pada setiap konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) ($p < 0,05$). Uji korelasi Spearman menunjukkan hubungan yang signifikan ($p < 0,05$) dan arah yang positif ($r = 0,972$ (*C. diphtheriae*) dan $0,981$ (*C. striatum*)). Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) memiliki efek sebagai antimikroba terhadap bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* secara *in vitro*.

Kata kunci : efek antimikroba, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, kelopak bunga rosella

ABSTRACT

Annizar, Nadia. 2018. "**Antimicrobial Effect of Roselle Calyx Extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) Against *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium striatum* Bacteria In Vitro**". Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Yuanita Mulyastuti, M.Si, (2) dr. Dearikha Karina Mayashinta, M.Biomed.

Corynebacterium sp. is increasingly known as a cause of disease. The most significant pathogens of this group are *C. diphtheriae* which is acted as a major cause of diphtheria and *C. striatum* which is potential for nosocomial and respiratory diseases. *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium striatum* show resistant to antimicrobial drugs therapy such as penicillin G, erythromycin, azithromycin, levofloxacin, and ciprofloxacin. Based on these reasons, alternative substances as potent antimicrobials are needed to inhibit the growth of *C. diphtheriae* and *C. striatum* bacteria. One way to inhibit the growth of *C. diphtheriae* and *C. striatum* bacteria is through the utilization of roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.) containing tannins, alkaloids, saponins and anthocyanins. This research aims to determine the antimicrobial effect of roselle calyx extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) in inhibiting the growth of *C. diphtheriae* and *C. striatum* bacteria by experimental designs using well diffusion method. The concentration of extract used in this research was 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% with five repetitions. The result showed different inhibitory zones at each plate increase in concentration. Statistical analysis using *Kruskal Wallis* test showed significant differences in *C. diphtheriae* and *C. striatum* inhibitory zones at each concentration of roselle calyx extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) ($p < 0,05$). *Spearman* correlation test showed a significant relationship ($p < 0,05$) and positive direction ($r = 0,972$ (*C. diphtheriae*) and $0,981$ (*C. striatum*)). It can be concluded that the roselle calyx extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) has an antimicrobial effect on the bacteria *C. diphtheriae* and *C. striatum* In Vitro.

Keywords: antimicrobial effect, *C. diphtheriae*, *C. striatum*, roselle calyx extract

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri merupakan mikroorganisme yang menyebabkan berbagai macam penyakit pada manusia mulai dari penyakit ringan hingga mengancam jiwa yang membutuhkan intervensi secepatnya (Divyang, 2009). Bakteri *coryneform* atau *Corynebacterium sp.* kini semakin dikenal sebagai penyebab penyakit oportunistik pada keadaan tertentu, seperti pada pasien yang daya tahan tubuhnya menurun, memakai alat prostetik, atau telah berada di rumah sakit atau rumah jompo untuk jangka waktu lama (Funke *et al.*, 1997). Patogen yang paling signifikan dari kelompok ini adalah *Corynebacterium diphtheriae* yang berperan sebagai penyebab utama difteri dan juga *Corynebacterium striatum* yang potensial terhadap penyakit nosokomial dan respirasi (Wagner *et al.*, 2012).

Difteri adalah infeksi bakteri akut terutama pada saluran napas atas meliputi tonsil, faring, laring atau mukosa hidung, ditandai dengan membran yang tebal, sebagai hasil dari eksotoksin *Corynebacterium diphtheriae*. Infeksi difteri dapat menyebabkan kematian pada manusia (Andayani, 2012). *Corynebacterium diphtheriae* merupakan bakteri gram positif, tidak bergerak, tidak membentuk spora, dan terlihat seperti palu dengan membentuk granula metakromatik pada ujungnya yang terlihat jelas dengan pewarnaan *methylene blue*. Bakteri berbentuk batang pleomorfik dan berubah-ubah dalam pewarnaan (diameter 0,3-0,8 x 1,0-8,0 um) (Putranto, 2014).

Di Indonesia, kasus difteri masih terjadi di berbagai daerah, bahkan cenderung mengalami peningkatan pada tahun-tahun terakhir. Di Asia Tenggara,

pada tahun 2011, Indonesia menempati urutan kedua dengan 806 kasus difteri (Lestari, 2012). Faktor virulensi utama *Corynebacterium diphtheriae* adalah toksigenisitas (kemampuan memproduksi toksin) bakteri. Toksin menimbulkan peradangan dan destruksi epitel pada daerah yang terinfeksi, akibatnya akan terjadi nekrosis jaringan dan terbentuk membran palsu (pseudomembran). Pseudomembran diikuti dengan terjadinya edema jaringan mukosa dibawahnya yang dapat menyebabkan terjadinya obstruksi saluran nafas (Sunarno *et al.*, 2013).

Corynebacterium striatum adalah patogen pada manusia yang kurang dikenal namun sering dikaitkan dengan infeksi serius baik pada orang yang memiliki daya tahan tubuh yang bagus maupun pada daya tahan tubuh yang menurun. Infeksi *Corynebacterium striatum* cenderung lebih sering terjadi pada pria dengan letak infeksi utama seperti aliran darah, paru-paru, dan sistem saraf pusat (Lee *et al.*, 2005). Merokok dinilai sebagai salah satu faktor risiko meningkatnya infeksi pada pria. *Corynebacterium striatum* adalah mikroorganisme yang berpotensi patogen dengan kemampuan menghasilkan wabah menular nosokomial dan kolonisasi pernafasan pada pasien dengan *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (COPD) lanjut (Renom *et al.*, 2007).

Sampai saat ini, belum ada pedoman untuk tatalaksana *Corynebacteria* yang ditemukan dalam tes sensitivitas secara *in vitro*. Pemberian antibiotika secara terus menerus dari perawatan sebelumnya berpotensi membuat bakteri ini resisten terhadap antimikroba tersebut (Chen *et al.*, 2012). Terapi obat antimikroba penicillin G, erithromycin, lazithromycin, levofloxacin, dan ciprofloxacin menunjukkan resistensi terhadap obat tersebut (Jagadeeshan, 2015).

Penggunaan obat tradisional sampai sekarang semakin luas di kalangan masyarakat karena merupakan bagian dari kebudayaan bangsa Indonesia. Obat tradisional yang sekarang banyak dikonsumsi di masyarakat adalah bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*). Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) memiliki khasiat untuk melancarkan pencernaan, antikanker, antihipertensi, antidiabetes, anti kejang, antibakterial, antihelmintik, memperlambat pertumbuhan jamur atau parasit penyebab demam tinggi, dan sebagai antioksidan. Tanaman ini mengandung senyawa flavonoid khususnya jenis antosianin serta betakaroten yang juga dapat mematikan *Mycobacterium tuberculosis* penyebab penyakit TBC (Mardiah *et al.*, 2009). Pada penelitian Komala tahun 2013 disebutkan bahwa ekstrak etanol dari kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) berperan sebagai antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus pneumoniae*, salah satu bakteri penyebab penyakit pada saluran pernafasan.

Hingga sekarang, belum ada penelitian yang membuktikan efek ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) terhadap *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*. Oleh karena itu akan dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai potensi ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) sebagai alternatif herbal yang sensitif terhadap bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* karena selain mudah dicari di Indonesia juga sudah terbukti menjadi antibakteri untuk bakteri gram positif yang lain.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek antimikroba ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*.

1.3.2 Tujuan khusus

- Mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan pertumbuhan bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*
- Mengukur diameter zona hambat ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap koloni bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* melalui metode difusi sumuran.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

- Dapat menjelaskan manfaat ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*
- Sebagai tambahan informasi dan dapat digunakan untuk pengembangan penelitian lebih lanjut tentang *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*

1.4.2 Manfaat praktis

- Meningkatkan pengetahuan akademis masyarakat dan kalangan perindustrian dalam bidang kesehatan tentang kegunaan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Corynebacterium diphtheriae*

Pada tahun 1884, Loeffler mengaplikasikan postulat Koch dan berhasil mengidentifikasi *Corynebacterium diphtheriae* sebagai agen penyebab difteri, yaitu penyakit yang disebabkan oleh toksin yang dihasilkan *Corynebacterium diphtheriae* dan pencegahannya bergantung pada pelaksanaan imunisasi efektif menggunakan molekul toxoid (Burkovski, 2014). Bakteri ini dapat menghasilkan toksin difteri ketika mengalami lisogeni oleh bakteriofaga tertentu (Putranto, 2014).

Informasi laboratorium minimum yang diperlukan untuk melaporkan spesimen positif *Corynebacterium diphtheriae* adalah sebagai berikut: sebagian besar biotipe bersifat katalase positif, urea negatif, nitrat positif (kecuali biotipe belfanti), pirazinamidase negatif, dan sistinase positif. Bakteri *Corynebacterium diphtheriae* juga akan memfermentasi glukosa, maltosa, dan pati (hanya varian *gravis* saja) (Efstratiou, 2000).

2.1.1 Taksonomi *Corynebacterium diphtheriae*

Kingdom : *Bacteria*

Phylum : *Actinobacteria*

Order : *Actinomycetales*

Suborder : *Corynebacterineae*

Famili : *Corynebacteriaceae*

Genus : *Corynebacterium*

Spesies : *Corynebacterium diphtheriae* (Salem, 2015)

2.1.2 Karakteristik *Corynebacterium diphtheriae*

2.1.2.1 Morfologi

Corynebacterium diphtheriae adalah bakteri gram positif non-motil, tidak berkapsul, nonsporulasi. Bakteri ini memiliki diameter 0,5-1 um. Pada medium *blood agar*, koloni *Corynebacterium diphtheriae* berukuran kecil, bergranular, dan abu-abu, dengan tepi tidak beraturan. *Corynebacterium diphtheriae* memiliki empat biotipe yaitu: *gravis*, *mitis*, *intermedius*, dan *belfanti*. Varian ini telah diklasifikasikan berdasarkan karakteristik pertumbuhan seperti morfologi koloni, reaksi biokimia, dan tingkat keparahan penyakit yang dihasilkan oleh infeksi (Brooks, 2007). Sel tunggal cenderung berkelompok dan berbentuk seperti huruf V, Y, atau tersusun palisade (Kayser, 2005).



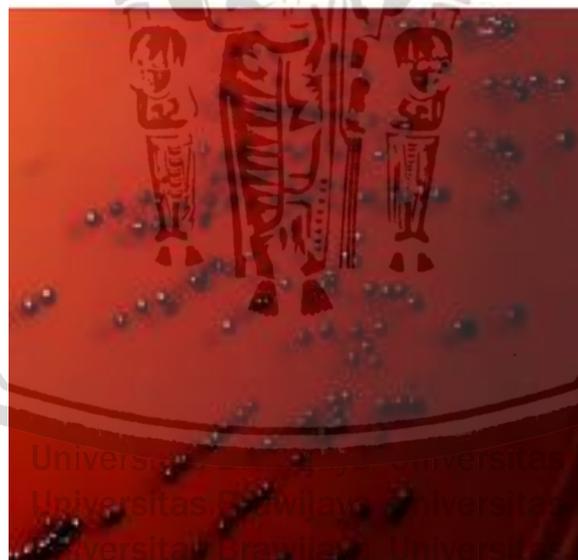
Gambar 2.1 *Corynebacterium diphtheria* dari pai medium yang dicat dengan methylene blue (Brooks, 2007)

2.1.2.2 Sifat Kultur dan Karakteristik Pertumbuhan

Menurut WHO pemeriksaan *Corynebacterium diphtheriae* dari spesimen klinis penderita idealnya dikultur menggunakan medium *blood agar* dan medium tellurite jenis Hoyle (Efstratiou, 2000). Medium selektif tellurite digunakan sebagai medium primer. Medium selektif adalah medium yang mengandung selain nutrisi juga ditambah suatu zat tertentu sehingga media tersebut dapat menekan

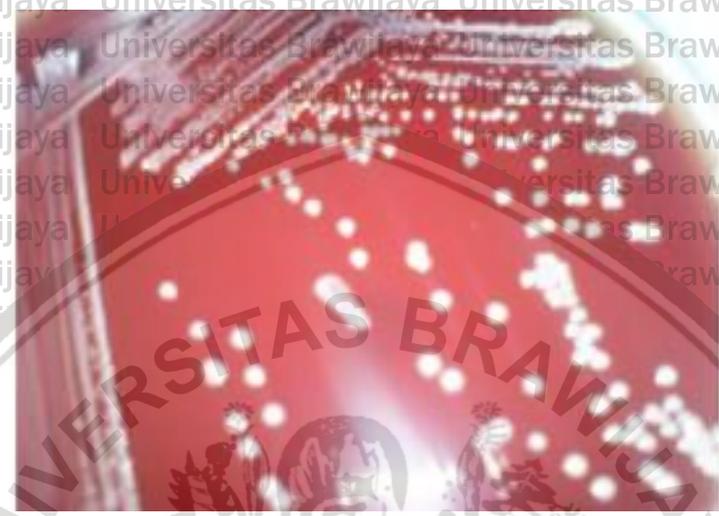
pertumbuhan mikroorganismenya dan merangsang pertumbuhan mikroorganismenya yang diinginkan (Efstratiou, 1999).

Pada medium *Cystine Tellurite Blood Agar* (CTBA) bentuk tellurite dalam kalium tellurite pada medium akan direduksi menjadi tellurium dan tidak hanya berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri flora normal tenggorokan, tetapi juga dimetabolisme oleh *Corynebacterium diphtheriae* menjadi bentuk koloni pertumbuhan berwarna hitam dan dapat membedakan bakteri lainnya yang tumbuh pada medium tersebut. Penggunaan darah dalam medium *Cystine Tellurite Blood Agar* (CTBA) ini dapat berupa darah domba, darah kuda atau darah kelinci. Penambahan darah berfungsi meningkatkan pertumbuhan dan recovery bakteri *Corynebacterium diphtheriae*, sementara adanya sistin pada medium *Cystine Tellurite Blood Agar* (CTBA) sebagai sumber asam amino yang meningkatkan produksi H₂S (Sariadji, 2015).



Gambar 2.2 *Corynebacterium diphtheria* pada medium CTBA (48 jam) (Sunarno, 2015)

Pada medium *Blood Agar* (BA) koloni menunjukkan warna lain. Pada medium ini koloni *Corynebacterium diphtheriae* berwarna putih mengkilat dengan diameter 1-3 mm (Sunarno, 2015)



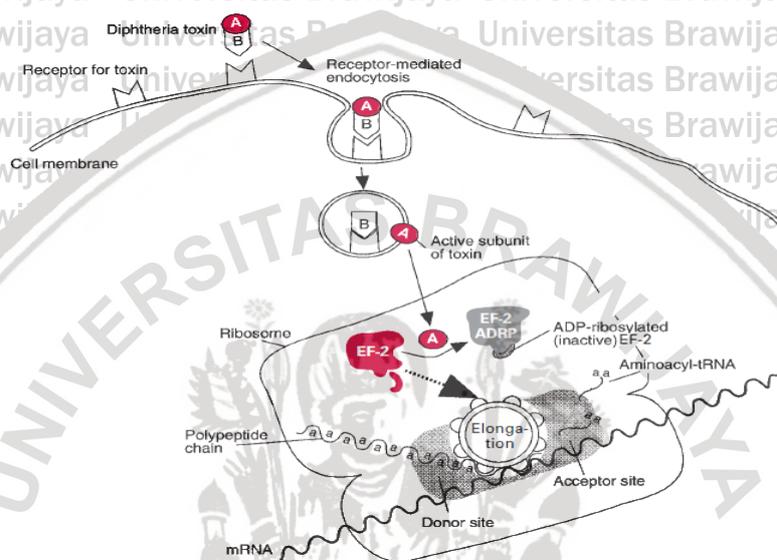
Gambar 2.3 *Corynebacterium diphtheria* pada medium BA (24 jam) (Sunarno, 2015)

2.1.3 Patogenesis Infeksi *Corynebacterium diphtheriae*

Corynebacterium diphtheriae memiliki kapasitas invasi yang rendah. Gejala lokal maupun sistemik yang dialami oleh penderita difteri disebabkan karena adanya efek toksin difteri, sebuah protein eksotoksin yang sangat berpotensi sitotoksik atau racun bagi sel (Champoux, 2004). Toksin *Corynebacterium diphtheriae* merupakan ikatan polipeptida yang tidak tahan panas. Apabila ikatan disulfida lepas maka akan terbentuk dua fragmen yang terdiri dari dua fungsi berbeda yaitu Fragmen A dan Fragmen B. Fragmen B berfungsi untuk berikatan dengan reseptor pada sel target. Sedangkan Fragmen A secara ireversibel menghambat translasi sel dengan cara menginaktivasi faktor EF-2 (Brooks, 2007). Toksin fragmen A menginaktivasi EF-2 dengan mengkatalisis reaksi yang menghasilkan nikotinamida bebas ditambah kompleks adenosin difosfat-ribosa-EF-2. Faktor EF-2 penting bagi ribosom sel target karena mengtransfer triplet code dari mRNA menjadi asam amino melalui tRNA.

Inaktivasi EF-2 menghentikan pembentukan rantai polipeptida pada sel target.

Hal ini menyebabkan sel tidak dapat menyintesis protein dan mati (Kayser, 2005).



Gambar 2.4 Patogenesis infeksi *C. diphtheriae* (Kayser, 2005)

2.2 *Corynebacterium striatum*

Genus *Corynebacterium* terdiri dari bakteri gram positif yang tersebar luas di lingkungan. Bakteri ini juga merupakan bagian dari mikrobiota normal kulit dan membran mukosa manusia. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa spesies genus ini, termasuk *Corynebacterium striatum*, menjadi patogen pada manusia dalam kondisi khusus, termasuk pada infeksi dari pasien dengan penyakit kronis, sering rawat inap yang berkepanjangan, terpapar antibiotik, penggunaan prosedur invasif dan adanya patologi obstruktif organik (Gomila, 2012).

Dalam kasus luka bedah, diagnosis infeksi oleh *Corynebacterium striatum* diperlukan isolasi organisme yang diambil dari luka bagian dalam dan

adanya minimal 3 dari tanda berikut ini: kemerahan, bengkak, panas, nyeri hipersensitivitas, dan abses (Martinez-Martinez *et al.*, 1997).

2.2.1 Taksonomi *Corynebacterium striatum*

Kingdom : *Bacteria*

Phylum : *Actinobacteria*

Order : *Actinomycetales*

Suborder : *Corynebacterineae*

Famili : *Corynebacteriaceae*

Genus : *Corynebacterium*

Spesies : *Corynebacterium striatum* (Salem, 2015)

2.2.2 Karakteristik *Corynebacterium striatum*

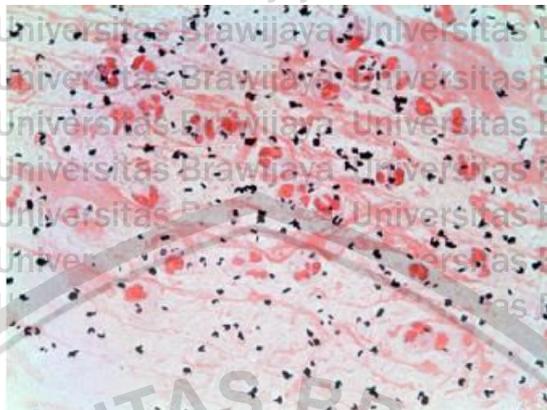
2.2.2.1 Morfologi

Pada pemeriksaan mikroskopik menggunakan pengecatan gram dari sampel aspirasi bronkus didapatkan banyak polimorfonuklear sel yang pendek, tebal, dan gram positif basil (Aguilar, 2013). Isolat *Corynebacterium striatum* dianggap patogen berdasarkan banyaknya neutrofil polimorfonuklear dan dominan pertumbuhannya pada kultur (Otsuka, 2006).

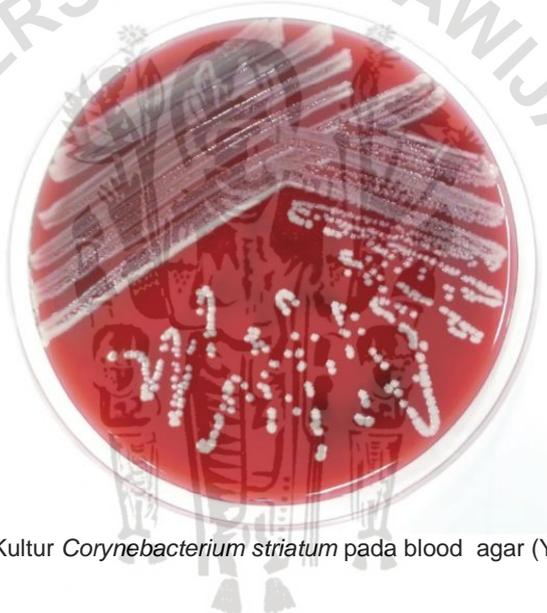
2.2.2.2 Sifat Kultur dan Karakteristik Pertumbuhan

Corynebacterium striatum dapat menyebabkan infeksi pada aliran darah pada pasien dengan daya tahan tubuh lemah, terutama mereka yang menggunakan peralatan medis seperti kateter intravena. kateter adalah rute utama dimana flora normal kulit seperti *Corynebacterium striatum* memasuki aliran darah. Identifikasi isolate bakteri *Corynebacterium striatum* menunjukkan

gram positif, katalase positif, nonmotil, dan aerobik atau fakultatif anaerob (Yang, 2015).



Gambar 2.5 *Corynebacterium striatum* pada pengecatan gram (Aguilar, 2013)



Gambar 2.6 Kultur *Corynebacterium striatum* pada blood agar (Yang, 2015)

2.3 Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

2.3.1 Morfologi Tanaman Rosella

Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) adalah tumbuhan yang berasal dari daerah tropis Afrika dengan spesies *Hibiscus* dan Family *Malvaceae*. Di beberapa daerah di Indonesia, buah ini dikenal dengan nama daerah masing-masing seperti gamet walanda di daerah Sunda, kasturi roriha di daerah Ternate (Haidar, 2009).



Gambar 2.7 Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) (Badan POM RI 2010)

Tanaman perdu dari keluarga sejenis kembang sepatu ini bisa mencapai 2,4 m tingginya. Batang berwarna merah, bulat, dan berbulu. Daunnya berseling 3-5 helai dengan panjang 7,5-12,5 cm dan berwarna hijau, ibu tulang daun kemerahan, tangkai daun pendek. Bentuk helaian daun bersifat anisofili (polimorfik), bentuk bulat telur, dan tepi daun beringgit sedikit berbulu. Bunga rosella bertipe tunggal yaitu hanya terdapat satu kuntum bunga pada setiap tangkai bunga. Mahkota bunga berjumlah 5 petal berbentuk bulat telur terbalik, berwarna kuning hingga kemerahan (Badan POM RI, 2010).

Bunga ini dilengkapi dengan tangkai sari dan putik. Tangkai sari tempat melekatnya kumpulan benang sari berukuran tebal dan pendek. Putik berbentuk tabung dan berwarna kuning atau merah. Bunga rosella bersifat hemaprodit sehingga mampu menyerbukkan sendiri (Maryani, 2005).

Buah rosella berbentuk bulat telur dengan ukuran 13-22 mm x 11-20 mm, tiap buah berisi 30-40 biji. Ukuran biji 3-5 mm x 2-4 mm, berwarna cokelat kemerahan. Buah kapsul, berbentuk bulat telur, ukuran buah 13-22 mm x 11-20

mm, tiap buah berisi 30-40 biji. Ukuran biji 3-5 mm x 2-4 mm dan berwarna coklat kemerahan (Badan POM RI, 2010).

2.3.2 Taksonomi Tanaman Rosella

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub-kelas : Dilleniidae

Ordo : Malvales

Familia : Malvaceae

Genus : Hibiscus

Spesies : *Hibiscus sabdariffa* L (Badan POM RI, 2010)

2.3.3 Kandungan Kimia Bunga Rosella

Setiap bagian tanaman rosella memiliki senyawa kandungan kimia yang bermanfaat baik untuk pengobatan ataupun sebagai bahan makanan. Salah satu diantaranya adalah kelopak bunga rosella yang memiliki kandungan kimia antara lain antosianin, betakaroten, vitamin C, tiamin, riboflavin, flavonoid dan niasin (Maryani, 2005). Dalam rosella juga terkandung tanin yang mempunyai daya antibakteri dengan cara mengerutkan dinding sel (Ajizah, 2004).

Berdasarkan penelitian, pada ekstrak kelopak bunga rosella juga mengandung zat seperti antosianin, saponin dan alkaloid (Yurdiansyah *et al.*, 2012). Flavonoid pada rosella terdiri dari flavonol dan pigmen antosianin yang berada dalam kelopak bunga rosella dalam bentuk glukosida yang terdiri dari *cyanidin-3-sambubioside*, *delphinidin-3-glucose*, dan *delphinidin-3-sambubioside*.

Sementara itu, flavonol terdiri dari gossypetin, hibiscetin, dan quercetin. Kelopak bunga rosella juga mengandung alkaloid, asam sitrat, polifenol, galaktosa pectin, polisakarida dan mukopolisakarida (Mardiah *et al.*, 2009).

Dalam 100 gram kelopak bunga rosella yang masih segar mengandung 260-280 mg vitamin C, vitamin B1 dan B2. Kandungan vitamin C rosella tiga kali lipat anggur hitam, sembilan kali lipat jeruk sitrus, dan sepuluh kali lipat lebih besar dari buah belimbing. Kelopak bunga rosella juga penuh dengan vitamin A, niasin dan vitamin D. Tak ketinggalan kelopak bunga rosella juga mengandung unsur mineral seperti kalsium, fosfor, potassium, dan zat besi (Mardiah *et al.*, 2009).

2.3.3.1 Tanin

Tanin merupakan kelompok polifenol yang larut secara kimiawi dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Tanin termasuk dalam senyawa metabolit sekunder yang ditemukan di dalam kelopak bunga rosella. Umumnya tannin dapat larut dalam air. Kelarutannya besar dan akan meningkat apabila dilarutkan dalam air panas. Begitu juga tannin akan larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton dan pelarut organik lainnya. (Hagerman, *et al.*, 1992).

Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Ajizah, 2004).

2.3.3.2 Saponin

Saponin adalah senyawa kimia jenis glikosida yang banyak ditemukan di berbagai jenis tumbuhan. Senyawa ini memiliki karakteristik berupa buih, sehingga ketika direaksikan dengan air dan dikocok maka akan terbentuk buih yang dapat bertahan lama. Selain itu, senyawa ini juga terdiri dari fat-soluble nucleus yang disebut aglycone yaitu triterpenoid atau alkaloid steroid.

Triterpenoid saponin banyak terkandung di dalam kedelai, kacang polong, teh, bayam, ginseng dan lain-lain. Sedangkan steroid saponin banyak terdapat dalam tomat, asparagus, dan oat (Hostettmann, 1995). saponin bekerja dengan cara

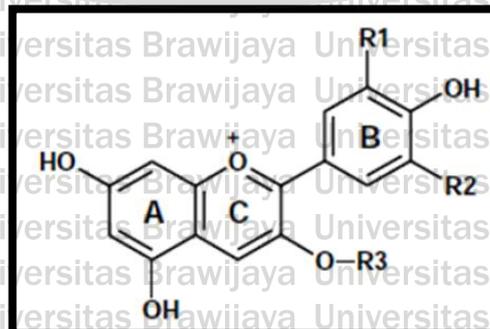
merusak membran sitoplasma dan membunuh sel. Saponin mampu berikatan dengan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan permeabilitas dinding bakteri meningkat (Arabski *et al.*, 2009).

2.3.3.3 Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa yang mengandung substansi dasar basa bernitrogen yang kebanyakan berbentuk heterosiklik. Alkaloid dapat diperoleh dari tumbuhan maupun hewan (IUPAC, 1997). Alkaloid memiliki mekanisme kerja dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga sel bakteri tidak dapat membentuk dinding sel atau pembentukan dinding sel dari bakteri itu tidak sempurna (Sjahid, 2008).

2.3.3.4 Antosianin

Antosianin merupakan pigmen yang menyebabkan warna merah, ungu dan biru pada tumbuhan. Senyawa ini tergolong dalam flavonoid. Struktur utamanya ditandai dengan adanya dua cincin aromatic benzene (C₆H₆) yang dihubungkan dengan tiga atom karbon. Kandungan khusus yang ada di yang terkandung dalam kelopak bunga rosella yaitu pigmen antosianin dalam bentuk glukosida yang terdiri dari *cyanidin-3-sambubioside*, *delphinidin-3-glucose*, dan *delphinidin-3-sambubioside*. Antosianin dapat menghinibisi oksidasi glukosa dan mengikat zat besi yang dibutuhkan oleh bakteri sehingga menghambat metabolisme bakteri.



Gambar 2.8 Struktur Antosianin (Juniarka, 2011)

2.3.4 Khasiat Kandungan Kimia dalam Bunga Rosella

Rosella memiliki berbagai macam khasiat yaitu sebagai pelancar pencernaan, antikanker, antihipertensi, antidiabetes, antikejang, antibakterial, anthelmintik (anticacing), memperlambat pertumbuhan jamur atau parasit penyebab demam tinggi, dan juga sebagai antioksidan (Komala, 2013).

Khasiat rosella tidak terlepas dari komposisi kimia yang dikandungnya.

Dalam rosella terkandung tanin yang mempunyai daya antibakteri dengan cara mengerutkan dinding sel bakteri sehingga dapat mengganggu permeabilitas sel itu sendiri, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik. Dinding sel yang terganggu ini menyebabkan dinding sel terganggu permeabilitasnya dan Efek antibakteri tanin lainnya antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik. (Ajizah, 2004).

Selain tanin kandungan lain yang ada di dalam kelopak bunga rosella adalah alkaloid. Alkaloid memiliki mekanisme kerja dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga sel bakteri tidak dapat membentuk dinding sel atau pembentukan dinding sel dari bakteri itu tidak sempurna. Efek alkaloid lainnya antara lain sebagai obat penenang, mengurangi rasa sakit, obat penyakit jantung dan lainnya (Sjahid, 2008).

Sementara itu, saponin bekerja dengan cara merusak membran sitoplasma dan membunuh sel. Saponin mampu berikatan dengan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan permeabilitas dinding bakteri meningkat (Arabski *et al.*, 2009).

Kandungan khusus yang ada di yang terkandung dalam kelopak bunga rosella yaitu pigmen antosianin dalam bentuk glukosida yang terdiri dari *cyandinin-*

3-sambubioside, delphinidin-3-glucose, dan delphinidin-3-sambubioside.

Antosianin dapat menghambat oksidasi glukosa dan mengikat zat besi yang dibutuhkan oleh bakteri sehingga menghambat metabolisme bakteri. Mekanisme antibakteri bekerja dengan mengganggu proses respirasi sel, menghambat aktivitas enzim bakteri, menekan terjemahan dari regulasi produk gen tertentu, dan menghalangi sintesis normal dinding sel bakteri. Sintesis yang tidak normal menyebabkan tekanan osmotik dalam sel bakteri lebih tinggi daripada di luar sel, maka terjadi kerusakan dinding sel bakteri yang akan menyebabkan kebocoran sel bakteri (Riwandy, 2014).

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair (Depkes, 2000 dalam Rahmawan, 2011). Berdasarkan fase yang terlibat, terdapat dua jenis ekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Pemindahan komponen dari padatan ke pelarut pada ekstraksi padat-cair melalui tiga tahapan, yaitu difusi pelarut ke dinding sel, di dalam dinding sel terjadi pelarutan padatan oleh pelarut, dan tahapan terakhir adalah pemindahan larutan dari pori menjadi larutan ekstrak. Ekstraksi padat cair dipengaruhi oleh waktu ekstraksi, suhu yang digunakan, pengadukan, dan banyaknya pelarut yang digunakan (Harborne 1996, dalam Rahmawan, 2011).

Metode ekstraksi dipilih berdasarkan polaritas senyawa yang akan diekstrak.

Metode ekstraksi dibagi ke dalam lima cara (Wientarsih dan Prasetyo, 2000),

yaitu :

1. Metode Maserasi

Metode maserasi merupakan salah satu teknik ekstraksi yang bertujuan menarik suatu komponen tertentu. Maserasi dilakukan dengan merendam sampel dalam pelarut pada jangka waktu tertentu. Ekstraksi ini merupakan jenis ekstraksi dingin karena tidak dilakukan pemanasan. Metode maserasi digunakan karena dinilai metode paling mudah dan murah serta dapat menarik zat aktif tumbuhan lebih efektif dibandingkan metode lainnya (Rahmawan, 2011).

2. Metode Perkolasi

Metode ini dilakukan dengan cara mencampur sepuluh bagian simplisia ke dalam lima bagian larutan pencuci. Setelah itu dipindahkan ke dalam percolator, dan ditutup selama 24 jam setelah itu dibiarkan menetes sedikit demi sedikit. Kemudian ditambahkan larutan pencuci secara berulang-ulang hingga terdapat selapis cairan pencuci. Percolat yang telah terbentuk kemudian diuapkan (Wientarsih dan Prasetyo, 2006).

3. Metode Digesti

Metode ini merupakan bentuk lain dari maserasi yang menggunakan panas seperlunya selama proses ekstraksi (Wientarsih dan Prasetyo, 2006).

4. Metode Infusi

Metode ini dilakukan dengan memanaskan campuran air dan simplisia pada suhu 90°C dalam waktu 5 menit. Selama proses ini berlangsung campuran terus diaduk dan diberi tambahan air hingga diperoleh volume infus yang dikehendaki (Wientarsih dan Prasetyo, 2006).

5. Metode Dekoksi

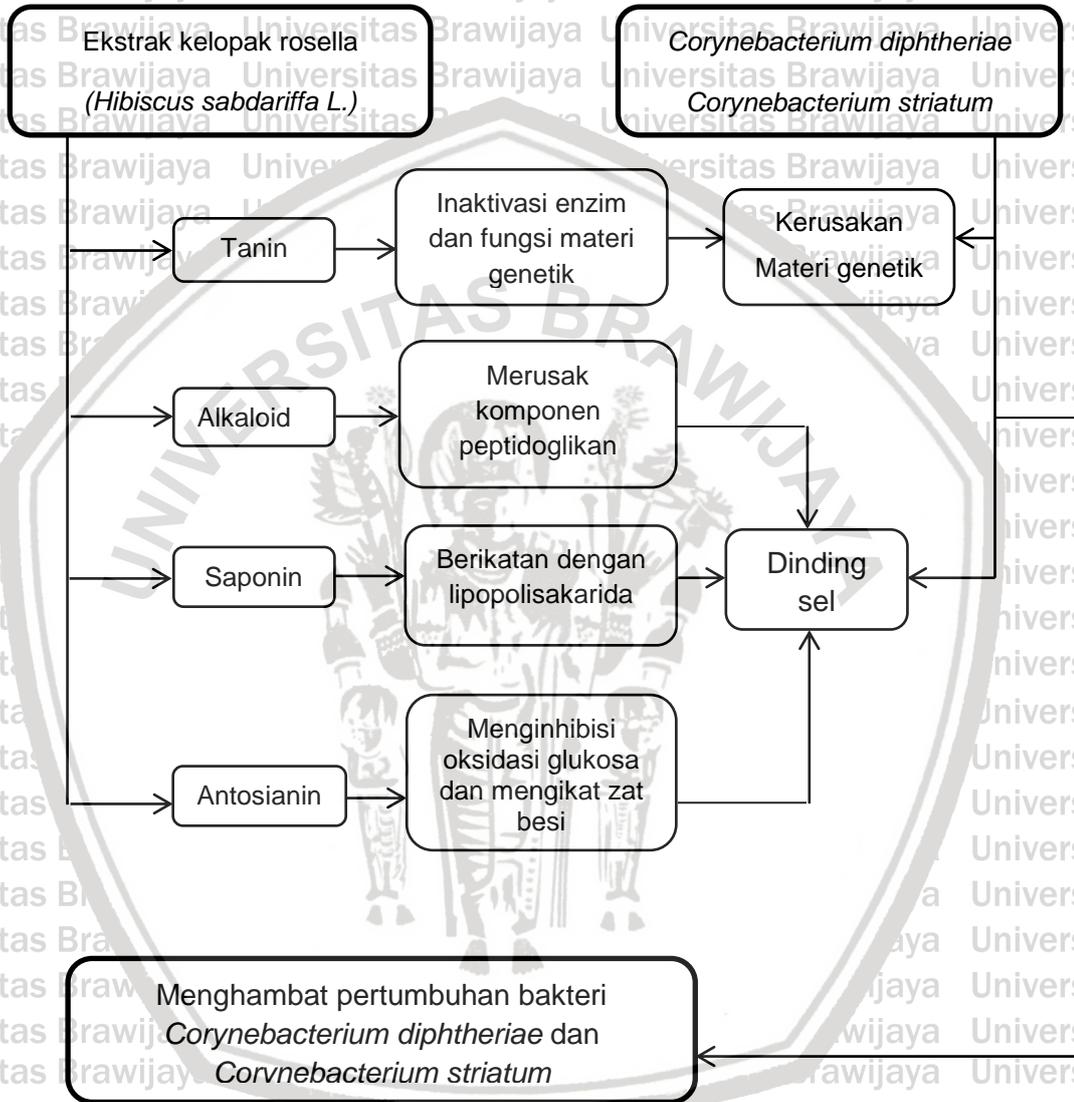
Metode yang digunakan sama dengan metode infuse hanya saja waktu pemanasannya lebih lama yaitu sekitar 30 menit (Wientarsih dan Prasetyo, 2006).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

Variable yang diamati :

Variable yang tidak diamati :

Tabel 3.1 Kerangka Konsep

Di dalam kelopak bunga rosella terkandung empat komponen utama yang berperan sebagai antimikroba yaitu tanin, alkaloid, saponin dan antosianin.

Tanin bekerja dengan menghambat enzim reserve transcriptase dari DNA topoisomerase, sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Robinson, 1995).

Tanin juga dapat mengerutkan dinding sel atau membran sel sehingga dapat mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri. Akibat dari terganggunya dinding

sel, sel bakteri tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya menjadi terhambat dan mati (Ajizah, 2004). Kandungan lainnya yaitu alkaloid

yang mekanisme kerjanya melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel bakteri akan mati (Lamothe, 2009).

Sedangkan saponin bekerja dengan cara berikatan dengan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri, menyebabkan meningkatnya permeabilitas dari dinding sel

bakteri (Arabski *et al.*, 2009). Sedangkan pigmen antosianin dalam bentuk glukosida yang terdiri dari *cyanidin-3-sambubioside*, *delphinidin-3-glucose*, dan

delphinidin-3-sambubioside dapat menginhibisi oksidasi glukosa dan mengikat zat besi yang dibutuhkan oleh bakteri sehingga menghambat metabolisme

bakteri. Mekanisme antibakteri antosianin bekerja dengan mengganggu proses respirasi sel, menghambat aktivitas enzim bakteri, menekan translasi dari

regulasi produk gen tertentu, dan menghalangi sintesis normal dinding sel bakteri.

3.2 Hipotesis

Ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah *True Experimental Laboratory – Post test only Control Group Design*. Uji kepekaan antimikroba yang dipakai adalah uji kepekaan antimikroba dengan metode difusi sumuran dengan tujuan untuk mengukur diameter zona hambat dari ekstrak kelopak bunga rosella terhadap biakan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* pada medium BAP.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2017 hingga April 2018.

4.3 Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Jumlah sampel yang didapat dengan menggunakan rumus perhitungan (Notobroto, 2005):

$p(n-1) \geq 15$, dengan:

p = jumlah perlakuan (terdiri dari lima macam perlakuan, atau konsentrasi ekstrak rosella).

n = jumlah pengulangan yang dibutuhkan

Penelitian ini menggunakan 7 konsentrasi yang berbeda, jadi pengulangan yang dibutuhkan sesuai dengan perhitungan berikut:

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

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 15 + 7$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 = 5$$

Dengan demikian, untuk memenuhi persyaratan uji statistik diperlukan 5 kali pengulangan dalam penelitian ini.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Independen

Variable bebas pada penelitian ini adalah ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Sebelum dilakukan penelitian definitif, dilakukan penelitian pendahuluan menggunakan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*).

4.4.2 Variabel Dependen

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat bakteri

Corynebacterium diphtheriae dan *Corynebacterium striatum*.

4.5 Definisi Operasional

1. Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang digunakan adalah kelopak bunga rosella yang berwarna gelap yang didapatkan dari toko jamu, Pasar Besar.
2. Ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) didapatkan dengan metode maserasi kelopak rosella kering menggunakan etanol 96%, kemudian dilakukan penyaringan dan penguapan dengan menggunakan *rotatory-evaporator*. Ekstrak yang didapat ini dianggap kandungan ekstrak sebesar 100%.
3. Isolat *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelumnya, *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang berasal dari spesimen dilakukan tes identifikasi bakteri terlebih dahulu.
4. Zona hambat adalah zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dan menunjukkan bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Diameter zona hambat diukur dalam satuan millimeter (mm) yang diukur dengan 5 kali pengulangan. Semakin lebar zona hambat maka semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak kelopak bunga rosella.

5. Kontrol positif adalah ekstrak kelopak bunga rosella 100% yang tidak dicampur dengan bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*.

6. Kontrol negatif adalah biakan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang tidak dicampur dengan ekstrak kelopak bunga rosella yang dapat digunakan sebagai standar jumlah pertumbuhan bakteri tanpa ekstrak kelopak bunga rosella.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan Kelopak Rosella

Kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) dipotong kecil-kecil dan dikeringkan kemudian dihaluskan dengan blender dan ditimbang sebanyak 500 gram (sampel kering).

➤ Alat dan Bahan untuk ekstraksi

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Kelopak bunga rosella (<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>) | 6. Spatula |
| 2. Neraca analitik | 7. Desikator |
| 3. Seperangkat alat ekstraksi soklet | 8. Penjepit cawan petri |
| 4. Gelas kimia 250 ml | 9. Timbel |
| 5. Botol timbang (cawan petri) | 10. Penangas air |
| | 11. Oven |
| | 12. Etanol 96% |

➤ Proses Ekstraksi

1. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi.
2. Kelopak rosella yang sudah dalam bentuk serbuk ditimbang (500 gram).
3. Sampel kering tersebut dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer 1 liter.
4. Kemudian direndam dengan etanol 96% hingga volumenya 600 ml.

5. Dikocok hingga benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
6. Didiamkan selama 1 malam sampai mengendap.
7. Setelah maserasi, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring whatman.
8. Proses maserasi ini dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih. Kemudian hasil maserasi siap untuk di evaporasi.

➤ **Proses Evaporasi**

1. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30° - 40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator* dan tabung pendingin, kemudian tabung pendingin dihubungkan dengan pompa sirkulasi air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik. Tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.
2. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam labu penampung sedangkan *rotatory evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin, dan alat pipa vakum dinyalakan. Pemanas aquades juga dinyalakan pada suhu 65°C (titik didih etanol) sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih dan etanol mulai menguap.
3. Hasil penguapan etanol dikondensasikan menuju labu penampung etanol sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot vakum.
4. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah menjadi kental, evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap

kemudian dioven selama 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa sehingga didapatkan ekstrak 100%.

4.6.2 Preparasi Bakteri

4.6.2.1 Tes Identifikasi Bakteri *C. diphtheria* dan *Corynebacterium striatum*

4.6.2.1.1 Pewarnaan Gram

➤ Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram Bakteri

- | | |
|------------------------------------|-------------------------|
| 1. Isolat bakteri | 5. Air |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 6. Safranin |
| dan <i>Corynebacterium</i> | 7. Gelas objek |
| <i>striatum</i> | 8. Ose |
| 2. Kristal violet | 9. Kertas penghisap |
| 3. Lugol | 10. Mikroskop binokuler |
| 4. Alkohol 96% | 11. Minyak emersi |

➤ Prosedur Pewarnaan Gram

1. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas obyek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas obyek. Kemudian dibiarkan kering di udara.
2. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara meletakkannya di atas api beberapa kali dan siap diwarnai.
3. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan perlahan-lahan menggunakan air.
4. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama 1 menit, lalu lugol tersebut dibuang dan dibilas dengan air.

5. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol dibuang dan dibilas dengan air.

6. Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.

7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat dibawah mikroskop.

4.6.2.1.2 Pewarnaan Neisser

➤ Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Neisser

- | | |
|-------------------------------------|------------------------|
| 1. Isolat bakteri | 4. Kertas saring |
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 5. Gelas objek |
| dan <i>Corynebacterium striatum</i> | 6. Ose |
| 2. Neisser AB | 7. Mikroskop binokuler |
| 3. Neisser C | 8. Minyak emersi |

➤ Prosedur Pewarnaan Neisser:

1. Menggenangi sediaan bakteri dengan Neisser AB selama 1 menit. Lalu buang genangan.
2. Menggenangi sediaan bakteri dengan Neisser C selama 30 detik lalu buang genangan.
3. Mengeringkan sediaan dengan kertas saring.
4. Melihat sediaan di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x dengan bantuan minyak emersi.

4.6.2.1.3 Tes katalase

➤ Alat dan Bahan untuk Uji Katalase

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1. Isolat bakteri <i>C. diphtheriae</i>
dan <i>C. striatum</i> | 3. H ₂ O ₂ 3% |
| 2. Gelas objek | 4. Ose |
| | 5. Pipet tetes |

➤ **Prosedur Pewarnaan Neisser:**

Tes katalase dilakukan dengan menyediakan pembedihan cair bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* pada gelas obyek.

Kemudian sediaan tersebut ditetesi dengan larutan H₂O₂ 3%. Perhatikan ada tidaknya gelembung udara yang terjadi. Hasil untuk *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* adalah ada gelembung / tes katalase positif.

4.6.2.1.4 Uji Biokimia

➤ **Alat dan Bahan untuk Uji Biokimia**

- | | |
|---|--------------|
| 1. Isolat bakteri <i>C. diphtheriae</i>
dan <i>C. striatum</i> | 4. Plate |
| 2. Medium NAP | 5. Inkubator |
| 3. <i>Vitek 2 Compact</i> | 6. Ose |

Uji biokimia akan dilakukan dengan menggunakan alat *Vitek 2 compact* yang merupakan alat pemeriksaan mikrobiologik otomatis tertentu untuk identifikasi bakteri dan uji kepekaan antibiotik.

➤ **Prosedur uji biokimia :**

- Mengambil koloni bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* dari nutrient agar.
- Koloni bakteri dilarutkan ke dalam 3 mL larutan NaCl 0,45% pH 4,5.
- Homogenisasi hingga terbentuk suspensi sesuai bakuan McFarland 0,5-0,63 yang diukur dengan *Vitek 2 compact*.

4. Gram positif card dimasukan dalam tabung suspensi dan diletakkan dalam cassette, masukkan ke *Vitek 2 compact*.

5. Hasil identifikasi akan didapatkan setelah inkubasi 2-8 jam.

4.6.2.1.5 CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar*)

➤ Alat dan Bahan untuk CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar*)

1. Isolat bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum*
2. Medium CTBA
3. Plate
4. Inkubator
5. Ose

➤ Prosedur CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar*) :

1. Isolat bakteri diinokulasikan ke medium CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar*) dan dilakukan duplo.
2. Kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C.
3. Selanjutnya dilakukan pengamatan ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri di medium CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar*). berupa koloni bulat kering yang berwarna hitam atau keabuan. Jika tidak ada pertumbuhan, artinya bakteri tersebut terhambat pada medium CTBA (*Cystine Tellurite Blood Agar*).

4.6.2.2 Pembuatan Suspensi Uji Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* dilakukan dengan cara:

1. Mengambil beberapa koloni bakteri dari kultur bakteri di medium agar dengan menggunakan ose, kemudian diinokulasikan ke *nutrient broth* agar dan diinkubasi selama 24-48 jam.

2. Melakukan pengukuran absorbansi larutan standard McFarland 0,5 diukur Optical Density (OD) = 0,1 dengan spektrofotometer pada gelombang 625 nm. Berdasarkan pengukuran, nilai absorbansi larutan standard McFarland 0,5 setara dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Tortora *et al.*, 2007).
3. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi bakteri yang mengandung 1×10^8 CFU/ml dengan dilakukan pengenceran dengan rumus sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

4.6.3 Pembuatan Medium Difusi Sumuran

➤ Alat dan Bahan untuk Uji Difusi Sumuran

1. Cawan petri
2. Mikropipet
3. Pelubang sumuran
4. Inkubator
5. Ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)
6. Suspensi bakteri
7. Bunsen
8. Korek api
9. Penggaris
10. Jangka sorong
11. Aquades
12. Blood Agar Plate

➤ **Prosedur Difusi sumuran :**

1. Sediakan 10 cawan petri, 5 untuk uji difusi sumuran *Corynebacterium diphtheriae* dan 5 lainnya untuk *Corynebacterium striatum*.
2. Tuangkan suspensi bakteri *C. diphtheria* dan *Corynebacterium striatum* 10^8 CFU/ml pada tiap cawan petri $\pm 0,5$ ml.
3. Tuangkan media hangat pada cawan petri yang telah diberi suspensi bakteri uji ± 15 ml. Biarkan media memadat dan membentuk agar.
4. Pada setiap media yang telah diinokulasi bakteri dibuat 7 lubang sumuran pada masing-masing cawan petri. Beri label nama bakteri, besarnya konsentrasi dan nomer cawan petri ke-1, ke-2, dst.
5. Pada masing-masing sumuran diberikan 5 μ L ekstrak dengan berbagai konsentrasi yang berbeda (0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%).
6. Media yang sudah diberi perlakuan dimasukkan ke inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.
7. Setelah itu dilakukan pengukuran dan pengamatan zona hambat, yaitu daerah jernih dekat sumuran. Selanjutnya hitung diameter zona hambat dengan jangka sorong.

4.6.4 Pengujian efek Antimikroba

Untuk pengujian efek anti mikroba disediakan 10 cawan petri. Disediakan pula larutan bakteri uji (*Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*) yang kemudian dicampur dengan bahan media *Blood Agar Plate*.

1. Pada uji pendahuluan masing-masing cawan petri yang telah dicampurkan suspensi bakteri dan 15 ml medium *Blood Agar Plate* kemudian dilubangi. Pada masing-masing lubang diberi ekstrak kelopak bunga rosella dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 0%. Sehingga didapatkan konsentrasi akhir sebesar 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, 0% sebagai konsentrasi pada penelitian ini dengan pengulangan sebanyak lima kali.
2. Semua cawan petri diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Periksalah zona hambat pada masing-masing konsentrasi di tiap cawan petri. Perhatikan dan catat diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm).

4.7 Analisis Data

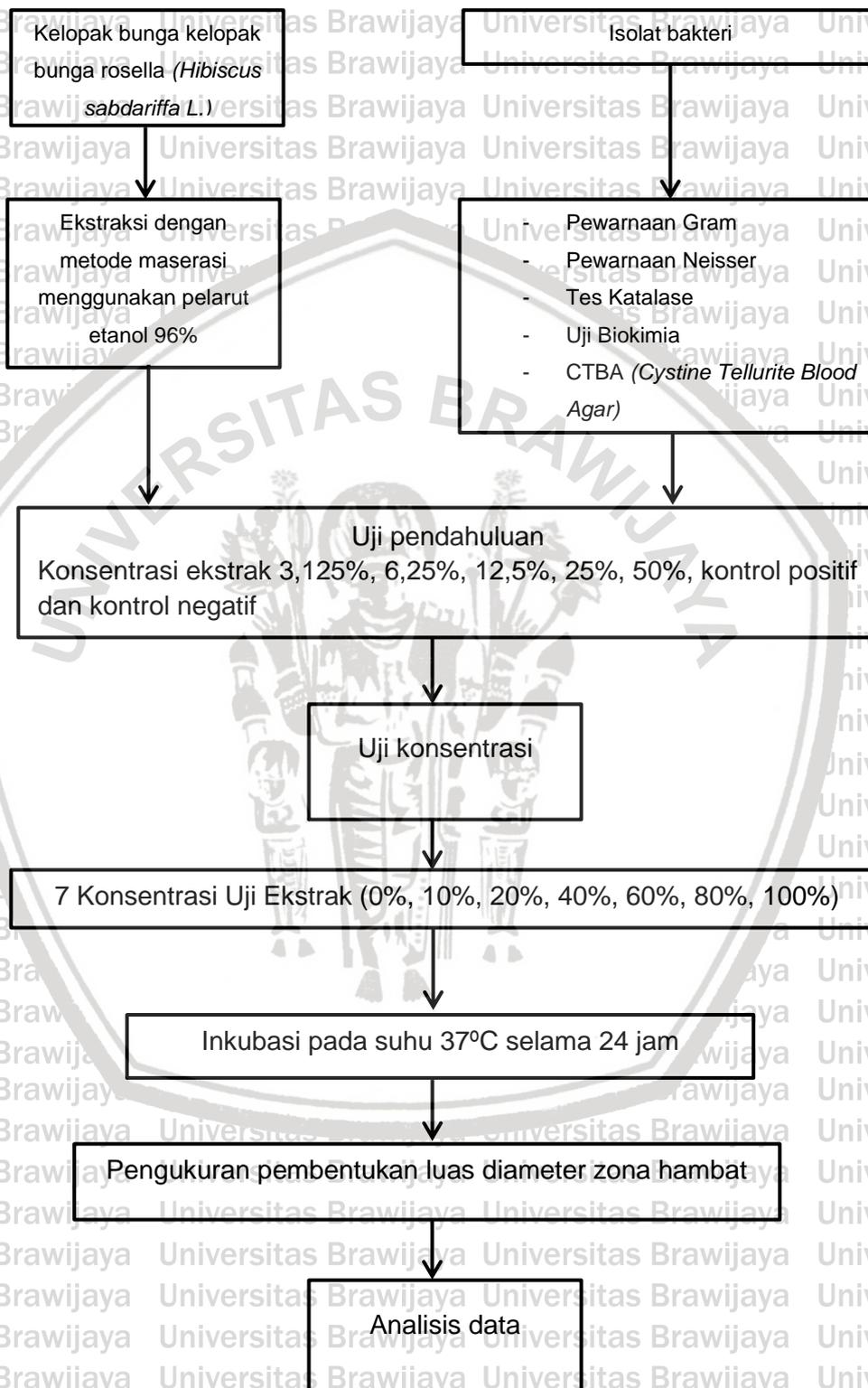
Analisis data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan program SPSS (Statistic Product of Service Solution) versi 20. Langkah-langkah analisis data pada penelitian ini terdiri dari:

1. Uji normalitas data menggunakan *Kolmogorov Smirnov Test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik).
2. Uji homogenitas menggunakan *Levene Test* untuk melihat varian data homogen atau tidak.
3. Uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan zona hambat yang terbentuk pada setiap konsentrasi pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*).
4. Uji *Mann-Whitney* dilakukan untuk melihat pasangan kelompok yang memberikan perbedaan signifikan.

5. Uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) dan efeknya.



4.8 Rancangan Operasional



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

1.1 Hasil Penelitian

1.1.1 Hasil Ekstraksi Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*)

Proses ekstraksi kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebanyak

200 gram menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Gambar

5.1 di bawah menunjukkan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*)

berwarna hitam keruh dengan konsentrasi kental.



Gambar 5.1 Ekstrak Kelopak Bunga Rosella

1.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan

Corynebacterium striatum

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium

Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Identifikasi

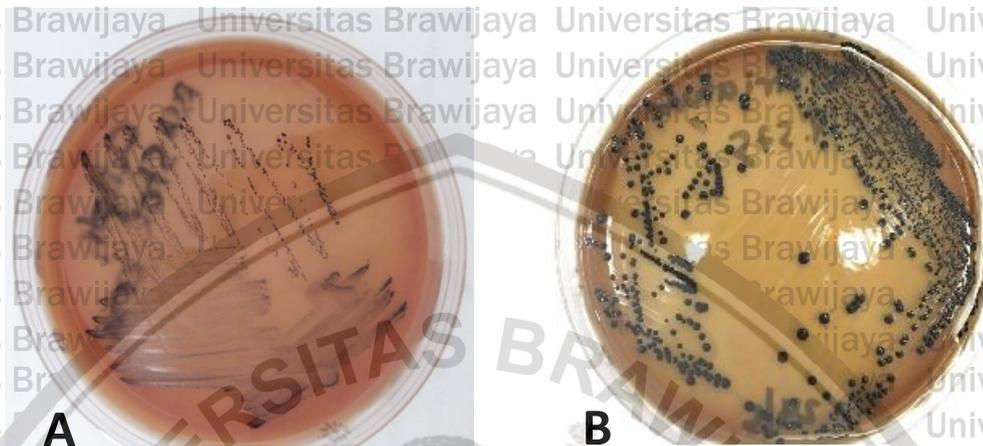
Corynebacterium diphtheriae dan *C.striatum* meliputi penanaman pada kultur

BTA, uji pewarnaan gram, uji pewarnaan Neisser, uji katalase, dan identifikasi

bakteri dikonfirmasi lagi dengan uji biokimia menggunakan mesin vitek2.

1.1.2.1 Kultur bakteri pada BTA

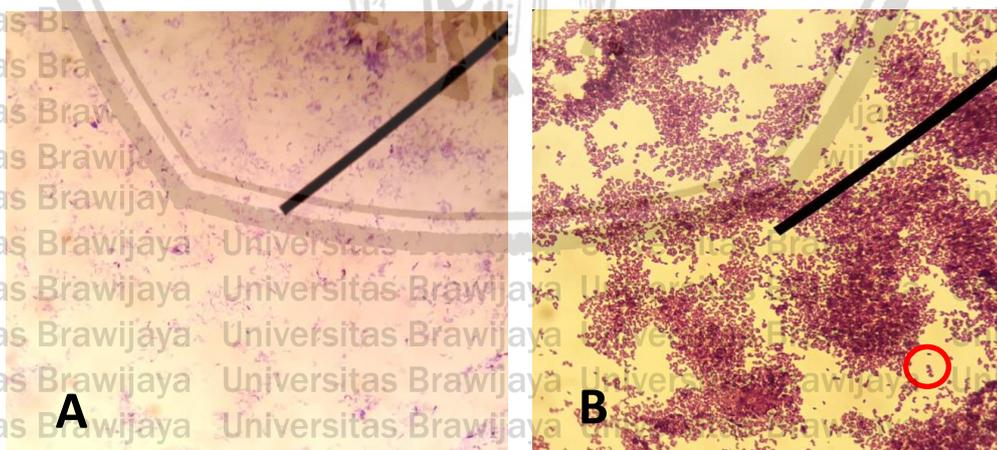
Pada penanaman bakteri di kultur *Blood Tellulite Agar* bakteri *C. diphtheriae* dan *C. striatum* menunjukkan koloni bulat berwarna kelan



Gambar 5.2 Hasil kultur BTA. A (*Corynebacterium diphtheriae*) dan B (*Corynebacterium striatum*)

1.1.2.2 Pewarnaan Gram

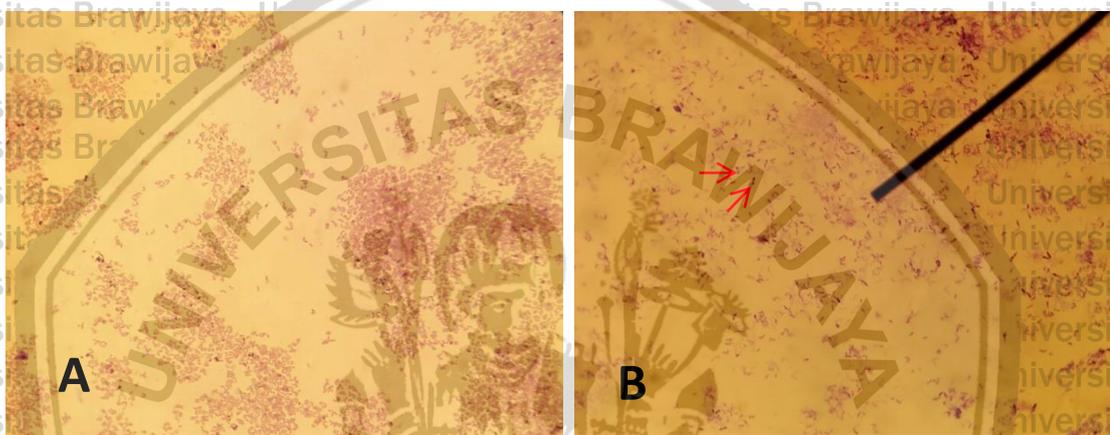
Pengamatan hasil pewarnaan gram menunjukkan bakteri gram positif berwarna keunguan dan berbentuk batang, dengan susunan sebagian tunggal dan sebagian yang lain berantai. Pada bakteri *Corynebacterium diphtheriae* cenderung berkelompok dan berbentuk seperti huruf V, Y, atau tersusun palisade.



Gambar 5.3 Pewarnaan Gram A (*Corynebacterium striatum*) dan B (*Corynebacterium diphtheriae*). Bagian dengan lingkaran merah menunjukkan *palisade appearance*.

1.1.2.3 Pewarnaan Neisser

Pada pewarnaan Neisser *C.diphtheriae* dan *C.striatum* terlihat bakteri berbentuk batang tersusun berpasangan berwarna ungu. Perbedaan keduanya adalah pada *Corynebacterium diphtheriae* ditemukan *metachromatic granule/drumstick appearance*, sedangkan pada *Corynebacterium striatum* tidak ditemukan yang berarti termasuk golongan *Non-Diphtheriae Corynebacterium*.



Gambar 5.4 Hasil Pewarnaan Neisser Bakteri A (*Corynebacterium striatum*) dan B (*Corynebacterium diphtheriae*). Bagian yang ditunjuk panah merah menunjukkan *metachromatic granule/drumstick appearance*.

1.1.2.4 Uji Katalase

Lingkaran merah pada gambar di bawah menunjukkan bahwa terdapat gelembung udara menandakan bakteri *C.diphtheriae* dan *C.striatum* memproduksi enzim katalase yang memecah H_2O_2 menjadi O_2 .



Gambar 5.5 Hasil Uji Katalase A (*C. diphtheriae*), B (*C. striatum*)

1.1.2.5 Uji Biokimia dengan Mesin Vitek2

bioMérieux Customer: RS Dr SYAIFUL ANWAR MALANG
Microbiology Chart Report
Printed Mar 8, 2017 10:54 CST

Patient Name: SURONO
Location: Lab ID: 07032017.3897
Organism Quantity: Selected Organism: *Corynebacterium striatum*
Source: KA
Physician: Isolate Number: 1

Collected:

Comments:

Identification Information
Selected Organism: *Corynebacterium striatum*
ID Analysis Messages

Analysis Time: 6.00 hours
95% Probability
Bionumber: 7303000400001
Status: Final

Biochemical Details

4	dGAL	+	5	LeuA	+	6	ELLM	+	7	PheA	(+)	8	ProA	+	10	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyrA	+	15	APPA	-	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUI	-	36	URE	-	37	BGURI	-
39	BGALI	-	41	AARA	-	42	AGALI	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	+
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGI	-	56	AMANI	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	?									

Gambar 5.6 Hasil Identifikasi *Corynebacterium striatum* Biokimia dengan Mesin Vitek2

bioMérieux Customer: RS Dr SYAIFUL ANWAR MALANG
Microbiology Chart Report
Printed Jan 22, 2015 08:00 ICT

Patient Name: Location: Lab ID: atcc
Selected Organism: *Corynebacterium diphtheriae*
Source: Collected:

Comments:

Identification Information
Selected Organism: *Corynebacterium diphtheriae*
ID Analysis Messages

Analysis Time: 6.00 hours
99% Probability
Bionumber: 6363000410001
Status: Final

Organism Quantity:
Critical Pathogen

Biochemical Details

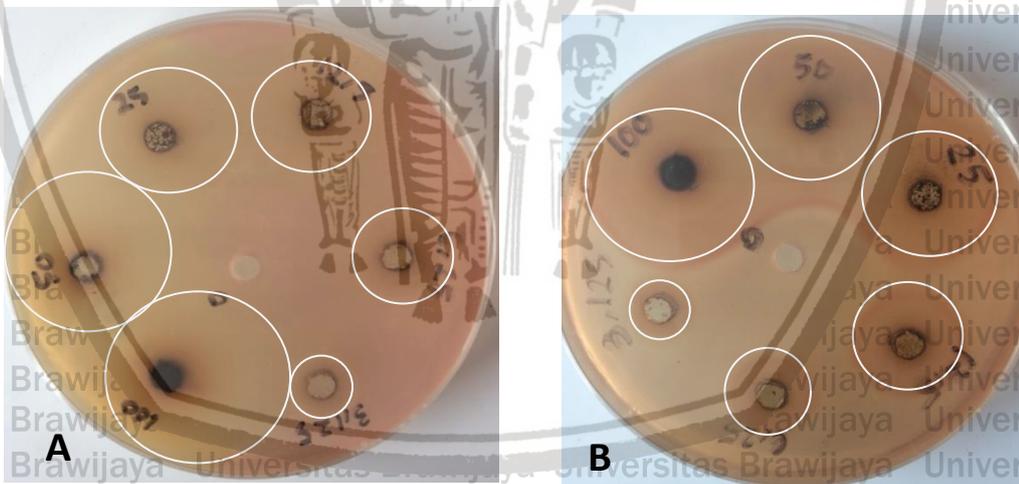
4	dGAL	-	5	LeuA	+	6	ELLM	+	7	PheA	+	8	ProA	+	10	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyrA	+	15	APPA	(+)	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUI	-	36	URE	-	37	BGURI	-
39	BGALI	-	41	AARA	-	42	AGALI	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	+
51	MTE	+	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGI	-	56	AMANI	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	?									

Gambar 5.7 Hasil Identifikasi *Corynebacterium diphtheriae* Biokimia dengan Mesin Vitek2

Lingkaran merah menunjukkan bahwa kemungkinan 95% bakteri yang diuji adalah *Corynebacterium striatum* dan 99% adalah bakteri *Corynebacterium diphtheriae*.

1.1.3 Hasil Penelitian Pendahuluan Menggunakan Metode Difusi Sumuran

Untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian ini, sebelumnya dilakukan penelitian pendahuluan menggunakan ekstrak kelopak bunga rosella dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Daya antibakteri ditandai dengan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri di sekeliling sumuran. Dari hasil penelitian pendahuluan konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dimulai dari konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% pada baik pada plate bakteri *Corynebacterium diphtheriae* maupun *Corynebacterium striatum*. Lalu dari hasil penelitian pendahuluan ini dapat disimpulkan bahwa untuk penelitian inti digunakan konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella sebesar 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.



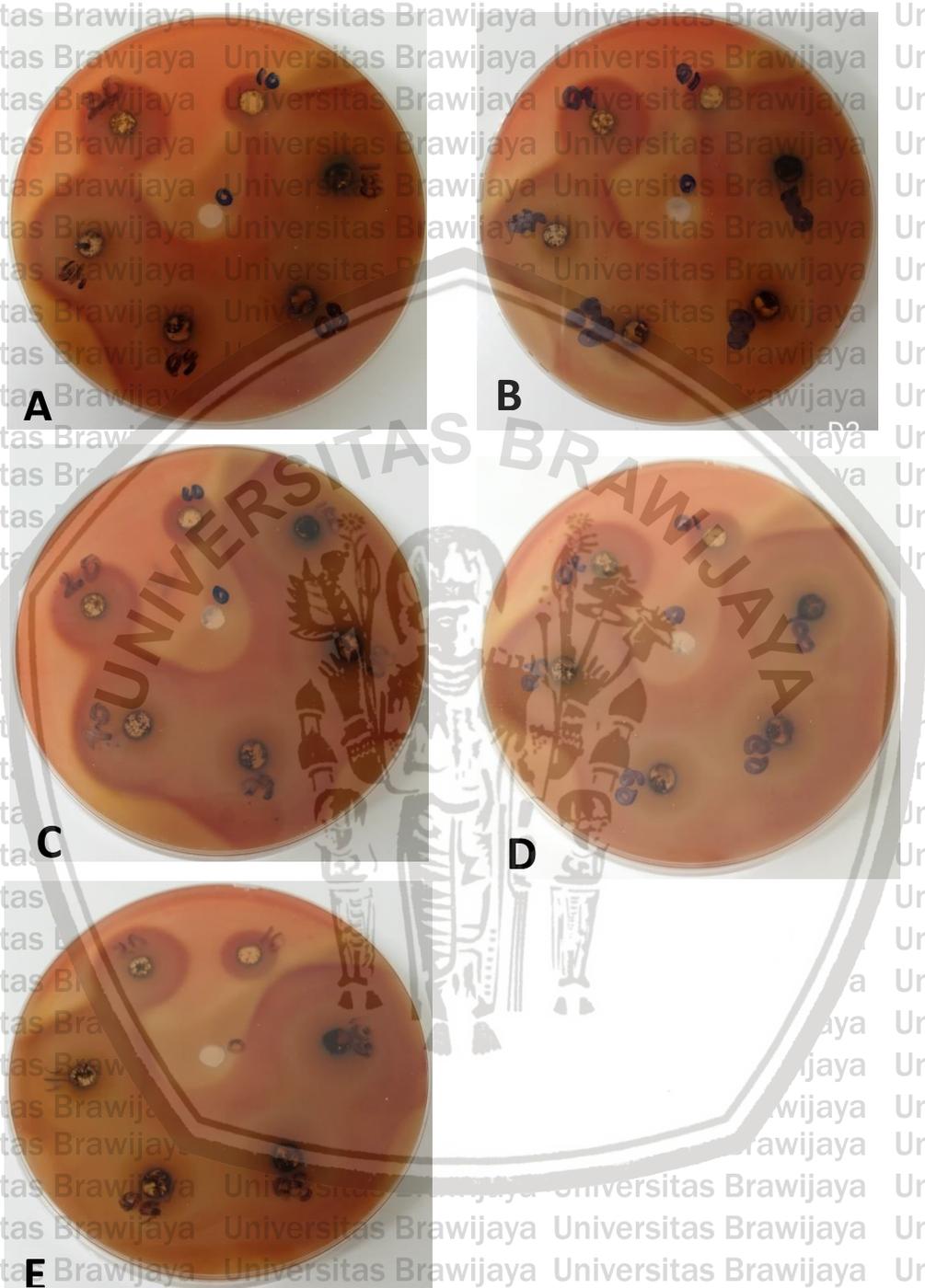
Gambar 5.8 Hasil uji pendahuluan difusi sumuran dengan konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella 100%, 50%, 25%, 12,5%, 5,25%, 3,125%, 0%. A (*Corynebacterium striatum*) dan B (*Corynebacterium diphtheriae*).

1.1.4 Hasil Penelitian Inti Menggunakan Metode Difusi Sumuran

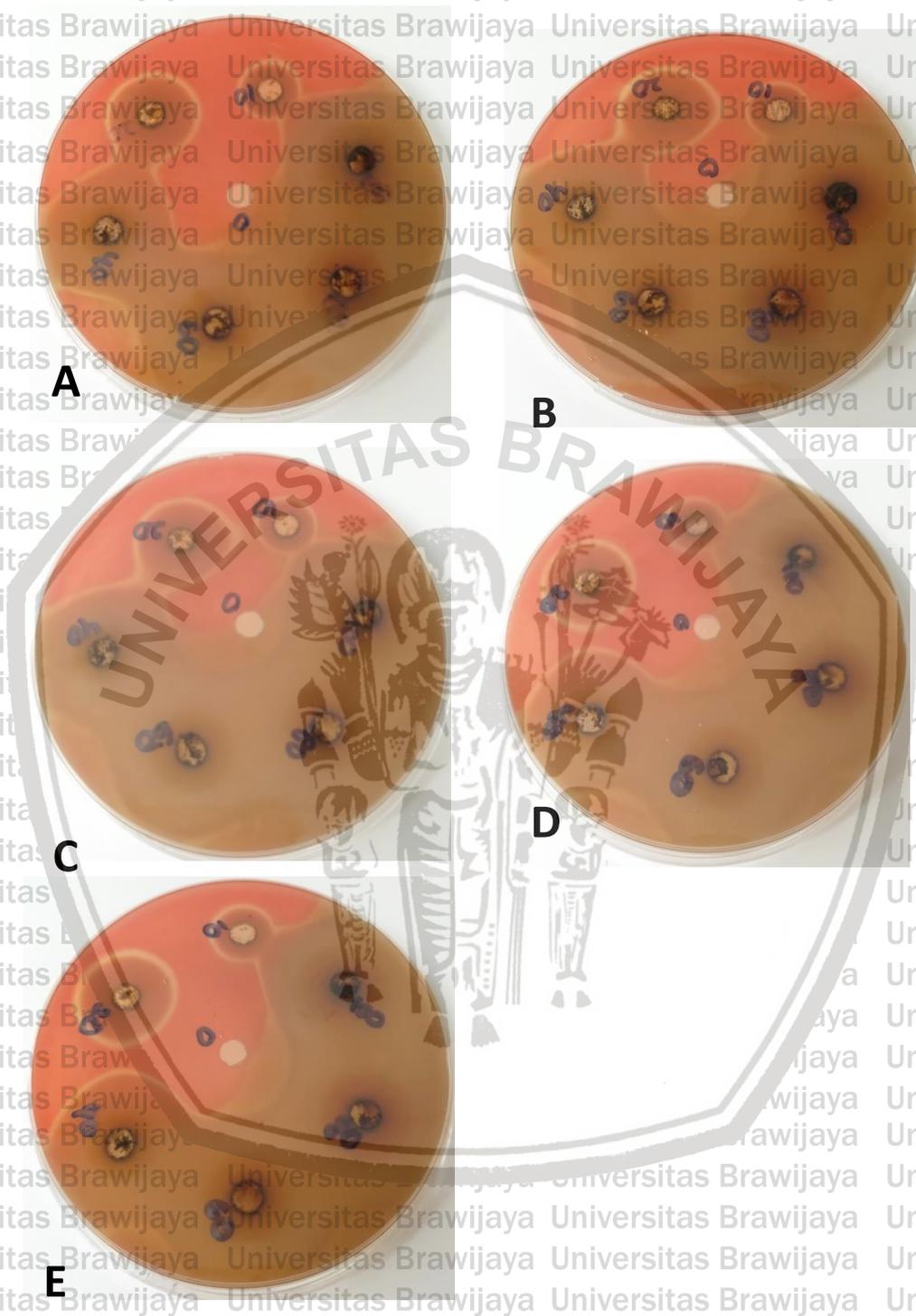
Penentuan zona hambat pada penelitian ini menggunakan difusi sumuran, penelitian ini dilakukan dengan mengamati terbentuknya zona hambat pertumbuhan bakteri disekeliling sumuran. Zona hambat yang dihasilkan

berbentuk lingkaran. Pengamatan hasil penelitian ini dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat dari bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang diinokulasikan pada cawan petri medium *blood agar* menggunakan jangka sorong. Konsentrasi yang digunakan adalah 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Hasil difusi sumuran dapat diamati pada gambar berikut.



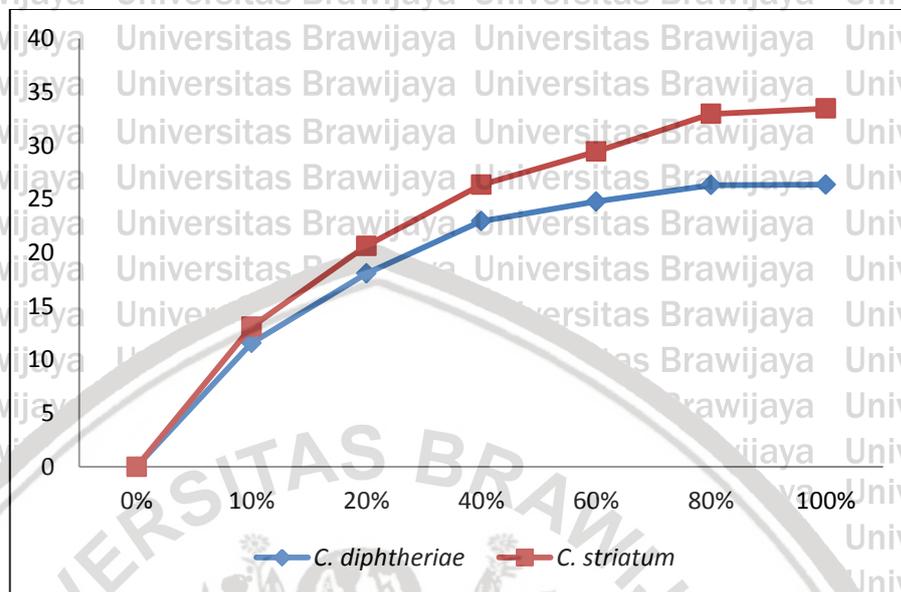


Gambar 5.9 Hasil uji difusi sumuran *Corynebacterium diphtheriae* dengan lima kali pengulangan konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, 0%



Gambar 5.10 Hasil uji difusi sumuran *Corynebacterium diphtheriae* dengan lima kali pengulangan konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, 10%, 0%

1.1.5 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri



Gambar 5.11 Rerata Diameter Zona Hambat yang Terbentuk di sekitar Lubang Sumuran Ekstrak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*)

1.2 Analisis Data

1.2.1 Hasil Pengujian Normalitas Data

Uji normalitas diperlukan untuk melihat apakah sampel memiliki distribusi normal atau tidak menggunakan uji statistik *Kolmogorov Smirnov* dan *Shapiro Wilk* terhadap masing-masing variabel.

Berdasarkan hasil analisis nilai signifikansi yang didapat untuk *Corynebacterium diphtheriae* adalah 0,000 dan untuk *Corynebacterium striatum* 0,001 (uji *Kolmogorov Smirnov*, $p > 0,05$) yang artinya data tidak terdistribusi normal atau terdapat perbedaan yang signifikan antara data yang akan diuji dengan data normal baku.

1.2.2 Hasil Pengujian Homogenitas Varian

Uji homogenitas varian digunakan untuk melihat varian data homogen atau tidak. Uji ini diperlukan sebagai syarat untuk melakukan uji one-way ANOVA

karena asumsi yang mendasari uji one-way ANOVA adalah varian data harus normal dan homogen.

Hasil uji homogenitas menggunakan Levene Test untuk *Corynebacterium diphtheriae* menunjukkan nilai signifikansi 0,036 sedangkan untuk *C. striatum* sebesar 0,001 yang mempunyai arti keduanya memiliki varian data yang tidak homogen (syarat terpenuhi bila $p > 0,05$). Hal ini tidak sesuai dengan prasyarat uji one-way ANOVA, sehingga penelitian ini menggunakan uji nonparametrik.

1.2.3 Hasil Uji Kruskal Wallis

Berdasarkan hasil penelitian zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*, dilakukan analisis data untuk melihat adanya perbedaan yang signifikan pada setiap konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Hipotesis ditegakkan dengan H_0 dan H_1 . H_0 diterima jika signifikansi yang diperoleh $> 0,05$.

Nilai signifikansi untuk bakteri *C. diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* adalah 0,000 yang mempunyai arti H_0 ditolak dan H_1 diterima, sehingga kesimpulan dari uji *Kruskal Wallis* adalah terdapat perbedaan efek antimikroba ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) terhadap bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* dalam beberapa konsentrasi.

1.2.4 Hasil Uji Mann Whitney

Dengan uji *Mann Whitney* dapat diketahui pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) mana saja yang memberikan perbedaan yang bermakna terhadap zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum*. Perbedaan antar dua konsentrasi ekstrak kelopak

bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang berbeda dikatakan berbeda signifikan jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) dan dikatakan tidak berbeda signifikan jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($p > 0,05$) (Tabe hasil Uji *Mann Whitney* terdapat pada lampiran).

Interpretasi hasil uji *Mann Whitney* bakteri *Corynebacterium diphtheriae* adalah sebagai berikut:

1. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* pada konsentrasi 0% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.
2. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* pada konsentrasi 10% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.
3. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* pada konsentrasi 20% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 40%, 60%, 80%, 100%.
4. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* pada konsentrasi 40% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 80%, 100% dan tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 60%.
5. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* pada konsentrasi 60% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 80%, 100%.
6. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium diphtheriae* pada konsentrasi 80% tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 100%.

Interpretasi hasil uji *Mann Whitney* bakteri *Corynebacterium striatum* adalah sebagai berikut:

1. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium striatum* pada konsentrasi 0% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.
2. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium striatum* pada konsentrasi 10% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%.
3. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium striatum* pada konsentrasi 20% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 40%, 60%, 80%, 100%.
4. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium striatum* pada konsentrasi 40% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 60%, 80%, 100%.
5. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium striatum* pada konsentrasi 60% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 80%, 100%.
6. Ukuran zona hambat bakteri *Corynebacterium striatum* pada konsentrasi 80% tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 100%

1.2.5 Hasil Uji Korelasi Spearman

Besar dan arah hubungan antara peningkatan ekstrak kelopak bunga *rosella* terhadap pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* pada medium blood agar dapat dihitung dengan uji korelasi *Spearman*. Hasil analisis uji korelasi *Spearman* dapat dilihat pada tabel 5.10 dan 5.11. Batasan nilai korelasi adalah -1 dan +1. Tanda negatif (-) menunjukkan hubungan antara dua variabel berbanding terbalik yang artinya semakin naiknya variabel independen, maka nilai variabel dependen semakin turun. Tanda positif (+) menunjukkan hubungan antara dua variabel berbanding lurus yang artinya semakin naiknya variabel independen, maka akan diikuti kenaikan variabel dependen.

Tabel 5.1 Koefisien Korelasi

Nilai Korelasi	Tingkat Hubungan
0,00-0,199	Sangat rendah
0,20-0,399	Rendah
0,40-0,599	Sedang
0,60-0,799	Kuat
0,80-1,00	Sangat kuat

1. Angka korelasi (r) = 0,972 (*Corynebacterium diphtheriae*) dan 0,981 (*Corynebacterium striatum*), yang artinya terdapat korelasi sangat kuat antara konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella dengan zona hambat yang terbentuk.
2. Tanda angka korelasi (+) atau arah korelasi berbanding lurus. Artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella, maka semakin tinggi pula zona hambat yang diperoleh.
3. Diperoleh nilai signifikansi 0,000, sehingga terdapat korelasi yang signifikan ($p < 0,05$) antara konsentrasi kelopak bunga rosella dengan zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

1.2.6 Hasil Uji Regresi

Uji regresi dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen. Untuk mengetahui hal tersebut, diperlukan nilai koefisien determinasi (R^2 atau *R square*).

Hasil uji regresi didapatkan nilai koefisien determinasi (R^2 atau *R square*) sebesar 0,823 (*Corynebacterium diphtheriae*) dan 0,887 (*Corynebacterium striatum*). Hal ini menunjukkan terdapat kemungkinan sebanyak 82,3% hambatan pertumbuhan bakteri *C. diphtheria* disebabkan oleh pemberian perlakuan,

sedangkan sisanya sebanyak 17,7% disebabkan oleh *confounding factor*.

Begitupun pada bakteri *Corynebacterium striatum* yang berarti sebanyak 88,7%

hambatan pertumbuhan bakteri *Corynebacterium striatum* disebabkan oleh pemberian perlakuan, sedangkan sisanya sebanyak 11,3% disebabkan oleh *confounding factor*.

Dari hasil analisis yang terdapat pada lampiran 2, didapatkan persamaan regresinya sebagai berikut:

- Hasil regresi *Corynebacterium diphtheriae* :

$$Y = 2.100 + 4.118X$$

- Hasil regresi *Corynebacterium striatum* :

$$Y = 0.994 + 5.320X$$

Hubungan antara kenaikan konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella terhadap zona inhibisi dapat dinyatakan dengan rumus $Y = A + BX$. Y adalah interval zona inhibisi dan X adalah konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella.

Dari rumus di atas dapat disimpulkan bahwa hubungan konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella terhadap pembentukan zona hambat adalah positif yang berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella maka semakin besar pula zona hambat yang terbentuk. Dari kedua rumus di atas juga dapat diketahui jika diperlukan konsentrasi sebesar 80,008% untuk *C. diphtheriae* dan 80,096% untuk *C. striatum* sebagai dosis optimum untuk dapat menyamai potensi dari kontrol positif.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya efek antimikroba dari ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* yang didapat dari stok kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian ini menggunakan kelopak bunga rosella karena manfaat, popularitas dan kemudahan untuk memperolehnya di berbagai tempat di Indonesia terutama Pulau Jawa. Kelopak bunga rosella mengandung bahan-bahan aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri seperti tanin, alkaloid, saponin, dan antosianin. Kandungan khusus yang terkandung dalam kelopak bunga rosella yaitu pigmen antosianin dalam bentuk glukosida yang terdiri dari *cyanidin-3-sambubioside*, *delphinidin-3-glucose*, dan *delphinidin-3-sambubioside* (Juniarka, 2011).

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi sumuran untuk mengetahui zona hambat pertumbuhan bakteri *Corynebacterium diphtheriae* dan *Corynebacterium striatum* dengan cara mengukur diameter dari zona hambat. Zona hambat adalah zona bening disekitar lubang sumuran yang mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan dari bakteri uji. Pengukuran zona hambat ditentukan dengan cara mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter setelah bakteri yang diinokulasikan pada medium *blood agar plate* diinkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam.

Sebelum dilakukan penelitian inti, terlebih dahulu dilakukan penelitian identifikasi dan penelitian pendahuluan. Penelitian identifikasi dilakukan untuk

memastikan kebenaran bakteri yang diuji. Sedangkan penelitian pendahuluan dilakukan dengan tujuan menentukan batasan konsentrasi ekstrak yang akan dipakai pada penelitian inti. Penelitian identifikasi bakteri terdiri dari pengecatan gram, pengecatan neisser, uji katalase, dan uji biokimia dengan mesin *Vitek2*. Dari hasil pewarnaan gram menunjukkan bakteri gram positif berwarna keunguan dan berbentuk batang. Pada pewarnaan neisser didapatkan ciri yang berbeda dari kedua bakteri. Untuk bakteri *Corynebacterium diphtheriae* pada pewarnaan neisser didapatkan gambaran *metachromatic granule* sedangkan pada bakteri *Corynebacterium striatum* tidak. Dari hasil uji katalase keduanya menunjukkan adanya gelembung gas, hasil ini menandakan bakteri *C.diphtheriae* dan *C.striatum* memproduksi enzim katalase yang memecah H_2O_2 menjadi O .

Langkah berikutnya yaitu melakukan penelitian pendahuluan. Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada uji pendahuluan adalah 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100%. Dari hasil penelitian pendahuluan terlihat mulai adanya hambatan pertumbuhan mulai dari konsentrasi 3,125%. Namun, karena penelitian ini berjalan dengan penelitian serupa yang menggunakan ekstrak lain maka konsentrasi yang digunakan pada penelitian inti sesuai dengan pohon penelitian menjadi 0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Dengan pemberian ekstrak kelopak bunga rosella sebanyak lima kali pengulangan didapatkan rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk pada bakteri *C.diphtheriae* adalah pada konsentrasi 10% adalah 11,56 mm, konsentrasi 20% adalah 18,048 mm, pada konsentrasi 40% adalah 22,946 mm, pada konsentrasi 60% adalah 24,772 mm, pada konsentrasi 80% adalah 26,316 mm, pada konsentrasi 100% adalah 26,352 mm, dan pada konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif adalah 0 mm.

Pada bakteri *C.striatum* rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk adalah pada konsentrasi 10% adalah 13,08 mm, konsentrasi 20% adalah 20,628 mm, pada konsentrasi 40% adalah 26,34 mm, pada konsentrasi 60% adalah 29,44 mm, pada konsentrasi 80% adalah 32,952 mm, pada konsentrasi 100% adalah 33,464 mm, dan pada konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif adalah 0 mm.

Dari data di atas kemudian dianalisis secara kualitatif dengan pengamatan visual dan kuantitatif dengan program SPSS versi 20. Dapat disimpulkan bahwa adanya perbedaan efek antimikroba dalam beberapa konsentrasi pemberian ekstrak kelopak bunga rosella terhadap zona hambat pertumbuhan koloni bakteri *C.diphtheriae* dan *C.striatum*. Semakin besar konsentrasi kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) yang diberikan, semakin besar pula zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

Penelitian ini selaras dengan penelitian Limyati dan Soegiyanto (2008) yang menunjukkan bahwa ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) dengan metode difusi dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus aureus* yang juga merupakan bakteri gram positif. Pada penelitian tersebut juga disebutkan bahwa pada konsentrasi 30% ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) memperlihatkan zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan ampisilin (20 µg/ml).

Pada penelitian yang dilakukan oleh (Muhammad, 2017) yang menguji pertumbuhan bakteri *Corynebacterium striatum* menggunakan *Allium sativum* yang mengandung bahan tannin dan saponin juga menunjukkan adanya efek antimikroba terhadap bakteri *Corynebacterium striatum*. Hasil penelitian lain (Immanuel, 2013) menggunakan *Annona muricata L.* yang mengandung turunan

flavonoid, alkaloid dan tannin juga menunjukkan efek terhadap bakteri *C.diphtheriae*.

Penelitian lain telah membuktikan adanya aktivitas antibakteri dari kelopak bunga rosella terhadap *E. coli* (gram negatif) diduga karena kandungan flavonoid yang mengganggu fungsi membran sitoplasma sel bakteri yang menyebabkan kebocoran metabolit penting sehingga sistem enzim bakteri terganggu (Dewi, 2013). Dengan demikian, potensi ekstrak kelopak bunga rosella sebagai antimikroba tidak terbatas pada gram positif, namun juga gram negatif..

Keterbatasan pada penelitian ini adalah menggunakan metode sumuran yang tidak bisa mengetahui efek bakteristatik dan bakteriosidal dari zat yang diuji. Metode sumuran hanya dapat meneliti potensi suatu senyawa terhadap hambatan pertumbuhan bakteri. Untuk mengetahui efek bakteristatik dan bakteriosidal dari suatu zat maka dapat diketahui dengan metode dilusi tabung (Pankey dan Sabath, 2004). Penelitian ini tidak menggunakan metode dilusi tabung dikarenakan penambahan ekstrak pada tabung membuat tabung keruh, sehingga tidak bisa membedakan apakah keruh disebabkan oleh bakteri atau bukan. Keterbatasan lainnya adalah peneliti tidak melakukan penelitian mengenai faktor-faktor lain yang mempengaruhi sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri seperti lama penyimpanan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*), pengaruh kekentalan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*), serta pengaruh proses ekstraksi yang tidak bisa memisahkan zat aktif secara khusus.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa kandungan dari ekstrak kelopak bunga rosella mampu menghambat pertumbuhan bakteri *C.diphtheriae* dan *C.striatum*. Manfaat klinis yang dapat dikembangkan dari hasil penelitian ini

adalah penggunaan ekstrak kelopak bunga rosella sebagai terapi alternatif pada infeksi bakteri *C.diphtheriae* dan *C.striatum*, sehingga dapat mengurangi resistensi antibiotik dan morbiditas penyakit. Karena penelitian ini masih bersifat *in vitro*, perlu dilakukan penelitian berikutnya baik secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk mengetahui dosis efektif, toksisitas, efek samping yang dihasilkan oleh ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) sebelum diuji coba pada manusia dan diaplikasikan pada masyarakat.



BAB 7

PENUTUP

1.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

a) Pemberian ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *C.diphtheriae* dan *C.striatum* secara *in vitro*.

b) Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*), maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

1.2 Saran

Saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah :

a) Perlu dilakukan uji antimikroba dengan menggunakan metode lainnya seperti dilusi tabung pada ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) terhadap bakteri *C.diphtheriae* dan *C.striatum* baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.

b) Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) terhadap bakteri lainnya.

c) Perlu dilakukan penelitian mengenai faktor-faktor lain seperti lama penyimpanan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*), pengaruh kekentalan ekstrak kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*), serta pengaruh proses ekstraksi yang tidak bisa memisahkan zat aktif secara khusus.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguilar, M., Ruiz-Garbajosa P., Fernandez-Olmos A., Guisado P., Del Campo R., Quereda C., et al. *Non-diphtheriae Corynebacterium* Species: An Emerging Respiratory Pathogen. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2013, 32(6), 769-772.
- Ajizah, A. Sensitivitas *Salmonella* Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L. *Bioscientiae*, 2004, 1(1), 31-38.
- Andayani, F., Rianto, B. U. D., SpTHT-KL, M. K. 2012. *Hubungan Kematian Difteri Pada Anak Dengan Status Imunisasi Di Propinsi Jawa Timur* (Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada).
- Anggarbeni, S. R. Uji Daya Hambat Air Rebusan Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Wiyata Penelitian Sains dan Kesehatan*, 2017, 2(1), 9-13.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Ornston, L.N., Jawetz, Melnick, Adelberg's. 2007. *Medical Microbiology*. Ed. 24. E-Book. United State.
- Burkovski, Andreas. *Corynebacterium diphtheriae and related toxigenic species*. Springer, 2014.
- Chen, F. L., Hsueh, P. R., Teng, S. O., Ou, T. Y., & Lee, W. S. *Corynebacterium striatum* bacteremia associated with central venous catheter infection. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2012, 45(3), 255-258.
- Dewi, E., Khairil K., Mudatsir M., Analisis Potensi Antibakteri Teh Rosela Terhadap Paparan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) Pada Mencit (*Mus musculus*). *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 2013, 13(2), 77-85.
- Dzen, SM, et al. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedia.
- Efstratiou, A., Engler K. H., Mazurova I. K., Glushkevich T., Vuopio-Varkila J., Popovic T. Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria. *Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(1), 138-145.
- Efstratiou, A., George R. C. Laboratory Guidelines for the Diagnosis of Infections Caused By *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Communicable Disease and Public Health*, 1999, 2, 250-257.
- Funke, G., von Graevenitz A., Clarridge J., Bernard, K. A. Clinical Microbiology of *Coryneform Bacteria*. *Clinical microbiology reviews*, 1997, 10(1), 125-159.
- Gomila, M., Renom F., Carmen Gallegos M., Garau M., Guerrero D., Soriano J. B., Lalucat J. Identification and Diversity of Multiresistant *Corynebacterium*

- Striatum* Clinical Isolates by MALDI-TOF Mass Spectrometry and By A Multigene Sequencing Approach. *BMC microbiology*, 2012, 12(1), 52.
- González-Lamothe, R., Mitchell G., Gattuso M., Diarra M. S., Malouin F., Bouarab, K. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(8), 3400-3419.
- Haidar, Zahra. 2009. *Si Cantik Rosella: Bunga Cantik Berjuta Khasiat*. Edumania: Jakarta
- Hostettmann, K., Marston A. 2005. *Saponins*. Cambridge University Press.
- IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*. 2nd ed. (the "Gold Book"). 1997. Online corrected version: 1995
- Jagadeeshan, N., Jayaprakash S., Ramegowda R. T., Manjunath C. N., Lavanya V. An Unusual Case of *Corynebacterium striatum* Endocarditis in A Patient With Congenital Lymphedema and Rheumatic Heart Disease. *Indian Heart Journal*, 2016, 68, 271-273.
- Juniarka, I. G. A., Lukitaningsih E. 2012. *Analisis Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Antosianin Total Ekstrak dan Liposom Kelopak Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa L.)* (Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada).
- Kayser, F. H., Bienz K., Eckert J., Zinkernagel R. 2005. *Color Atlas of Medical Microbiology*. New York: Thieme, 3(4), 231-3.
- Komala, O., Rosyanti, R., Muztabadihardja, M. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Air Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Terhadap Bakteri *Streptococcus pneumoniae*. *Berita Biologi*, 2013, 12(1).
- Lee, P. P., Ferguson Jr D. A., Sarubbi F. A. *Corynebacterium striatum*: An Underappreciated Community And Nosocomial Pathogen. *Journal Of Infection*, 2005, 50(4), 338-343.
- Lestari, K. S. 2012. *Faktor-Faktor yang Berhubungan Dengan Kejadian Difteri Di Kabupaten Sidoarjo*. (Thesis, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia).
- Limyati, D. A., Soegianto L. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes*. *Jurnal Obat Bahan Alam*, 2008, 7(1), 47-53.
- Mardiah, S., Ashadi R. W., Rahayu A. 2009. *Budidaya dan Pengolahan Rosela Si Merah Segudang Manfaat*. Agromedia Pustaka. Jakarta, 23.
- Martinez-Martinez, L., Suarez A., Rodriguez-Bano J., Bernard K., Muniain M. A. Clinical Significance of *Corynebacterium striatum* Isolated from Human Samples. *Clin Microbiol Infect*, 1997, 3, 634–639.

- Maryani, H., Lusi K. 2005. *Khasiat dan Manfaat Rosela*. Jakarta : Agro Media Pustaka.
- Muhammad, G. M. 2017. *Uji Potensi Antimikroba Ekstrak Bawang Putih (Allium Sativum) Terhadap Bakteri Corynebacterium striatum Secara Invitro*. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Notobroto, B. H. 2005. *Penelitian Eksperimental dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Perhitungan Besar Sampel Angkatan III*. Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Otsuka, Y., Ohkusu K., Kawamura Y., Baba S., Ezaki T., Kimura S. Emergence of Multidrug-Resistant *Corynebacterium striatum* As A Nosocomial Pathogen In Long-Term Hospitalized Patients With Underlying Diseases. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2006, 54(2), 109-114.
- Pankey, G. A., Sabath L. D.. Clinical Relevance Of Bacteriostatic Versus Bactericidal Mechanisms Of Action In The Treatment Of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical infectious diseases*, 2004, 38(6), 864-870.
- Putranto, R. H., Kambang S., Sunarno, Roselinda. 2014. *Corynebacterium diphteri*. Diagnosis Laboratorium Bakteriologi. Jakarta. Yayasan Pustaka Obor Indonesia.
- Rahmawan, A. H. 2011. *Bioaktivitas Ekstrak Etanol Suren Beureum (Toona sinensis roemor) Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach*. Bogor: Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor.
- Rani, I. Potensi Senyawa Tannin Dalam Menunjang Produksi Ramah Lingkungan. *CEFARS: Jurnal Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*, 2012, 3(2), 46-55.
- Renom, F., Garau M., Rubí M., Ramis F., Galmes A., Soriano J. B. Nosocomial Outbreak Of *Corynebacterium striatum* Infection In Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal Of Clinical Microbiology*, 2007, 45(6), 2064-2067.
- Riwandy, A., Didit A., Lia Y. B. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Kelopak Bunga Rossella (*Hibiscus Sabdariffa L.*) Terhadap Pertumbuhan Streptococcus Mutans *In Vitro*. *Fakultas Kedokteran, Program Studi Kedokteran Gigi Banjarmasin: Universitas Lambung Mangkurat*, 2014, 2(1), 60-64.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB, 14(3), 1-6.
- Salem, N., Salem L., Saber S., Ismail G., Bluth M. H. *Corynebacterium urealyticum*: A Universal and Comprehensive Review of An Understated Organism. *Infection and drug resistance*, 2015, 8, 129.

Sariadji, K., Sunarno S., Khariri K., Puspendari N., Muna F., Rukminiati, Y. Selektivitas Medium *Cystine Tellurite Blood Agar* (CTBA) terhadap Beberapa Isolat Bakteri. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 2015, 5(1), 19-24.

Sjahid, L. R. 2008. *Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid Dari Daun Dewandaru (Eugenia uniflora L.) (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Surakarta)*.

Sunarno, S., Kambang S., Holly A. W. Potensi Gen Dtx Dan Dtxr Sebagai Marker Untuk Deteksi Dan Pemeriksaan Toksigenisitas *Corynebacterium diphtheriae*. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 2013, 41(1 Mar), 1-10.

Sunarno, D. R., Noer E. P., Kambang S., Rudi H. P. 2015. *Pengembangan Metode Diagnostik Cepat Laboratorium untuk Identifikasi Penyebab Difteri: Aplikasi PCR Multipleks untuk Identifikasi Cepat Penyebab Difteri*. Yayasan Pustaka Obor Indonesia.

Tortora, G. J., Funke B. R., Case C. L. 2007. *Microbiology an introduction 9th edition*, Pearson edition, Inc., Publishing as Pearson Benjamins Cummings, San Francisco, 1301 Sansome.

Wientarsih, I., B. F. Prasetyo. 2006. Diktat Farmasi dan Ilmu Resepsir. *Bogor: Bagian Farmasi Pendidikan Profesi Dokter Hewan Institut Pertanian Bogor*.

Wagner, K. S., White J. M., Lucenko I., Mercer D., Crowcroft N. S., Neal, S. Diphtheria Surveillance Network. Diphtheria in the postepidemic Period, Europe, 2000–2009. *Emerging infectious diseases*, 2012, 18(2), 217.

Yang, H. S., Kim Y. J., Cho S. Y., Shin E., Lee H. J. Central Venous Catheter-Related Bloodstream Infection By *Corynebacterium striatum* Identified By 16S rRna And rpoB Gene Sequencing. *Annals Of Laboratory Medicine*, 2015, 35(5), 548-550

Yurdiansyah, A., Suhartanti D. Test Activities Antifungal Methanol Extract Red Flowers Rosella Calyx (*Hibiscus sabdariffa L.*) on *Candida albicans*, As In Vitro, and Screening Phytochemicals. In *Proceeding of the International Conference on Green World in Business and Technology (IC-GWBT2012)*, 2012, 116-122.