

**UJI EFEKTIFITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK RIMPANG TEMU KUNCI  
(*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) TERHADAP PERTUMBUHAN  
*Streptococcus pyogenes* SECARA *IN VITRO***

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Gigi**



**Oleh:**

**Fariza Rismaditta Arini**

**NIM: 105070401111015**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2014**

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Judul .....	i
Halaman Persetujuan .....	ii
Kata Pengantar .....	iii
Abstrak .....	v
Abstract .....	vi
Daftar Isi .....	vii
Daftar Gambar .....	xi
Daftar Tabel .....	xii
Daftar Lampiran .....	xiii
Daftar singkatan .....	xiv

**BAB I PENDAHULUAN**

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 Pendidikan .....	4
1.4.2 Manfaat Masyarakat .....	5



**BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**

2.1 Infeksi Saluran Akar .....	6
2.2 Mikrobiologi Saluran Akar .....	6
2.2.1 Bakteri <i>Streptococcus</i> .....	7
2.2.2 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	9
2.2.2.1 Morfologi dan Karakteristik <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> .....	9
2.2.2.2 Penentu Patogenitas dan Toksin <i>Streptococcus</i> <i>pyogenes</i> .....	11
2.3 Rimpang Temu Kunci ( <i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) <i>Schlech</i> ) .....	13
2.3.1 Morfologi Rimpang Temu Kunci .....	13
2.3.3 Kandungan Rimpang Temu Kunci .....	15
2.3.2.1 Minyak Atsiri .....	15
2.3.2.2 Saponin .....	15
2.3.2.3 Flavonoid .....	16
2.3.2.4 Tannin .....	17
2.4 Aktifitas Farmakologi .....	17
2.5 Antibakteri .....	18
2.6 Ekstraksi .....	19
2.6.1 Metode Ekstraksi .....	20
2.7 Uji Antibakteri .....	21



2.7.1 Metode Dilusi .....	21
2.7.2 Metode Difusi .....	22

**BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	23
3.2 Hipotesis Penelitian .....	24

**BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN**

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian .....	25
4.2 Sampel Penelitian .....	25
4.3 Variabel Penelitian .....	26
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	26
4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian .....	26
4.5.1 Bahan pembuatan ekstrak rimpang temu kunci ( <i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schlech) .....	26
4.5.2 Alat pembuatan ekstrak rimpang temu kunci ( <i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schlech) .....	26
4.5.3 Bahan identifikasi bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	27
4.5.4 Alat identifikasi bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	27
4.5.5 Bahan uji kepekaan ekstrak rimpang temu kunci ( <i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schlech) terhadap bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	27
4.6 Definisi Operasional .....	27



4.7	Prosedur Penelitian .....	28
4.7.1	Persiapan .....	28
4.7.2	Tes Identifikasi kuman .....	29
4.7.3	Persiapan Suspensi Bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	31
4.7.4	Pembuatan ekstrak rimpang temu kunci ( <i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schlech) .....	31
4.7.5	Uji aktivitas antibakteri ekstrak rimpang temu kunci ( <i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schlech terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	32
4.8	Analisis Data .....	36

## **BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

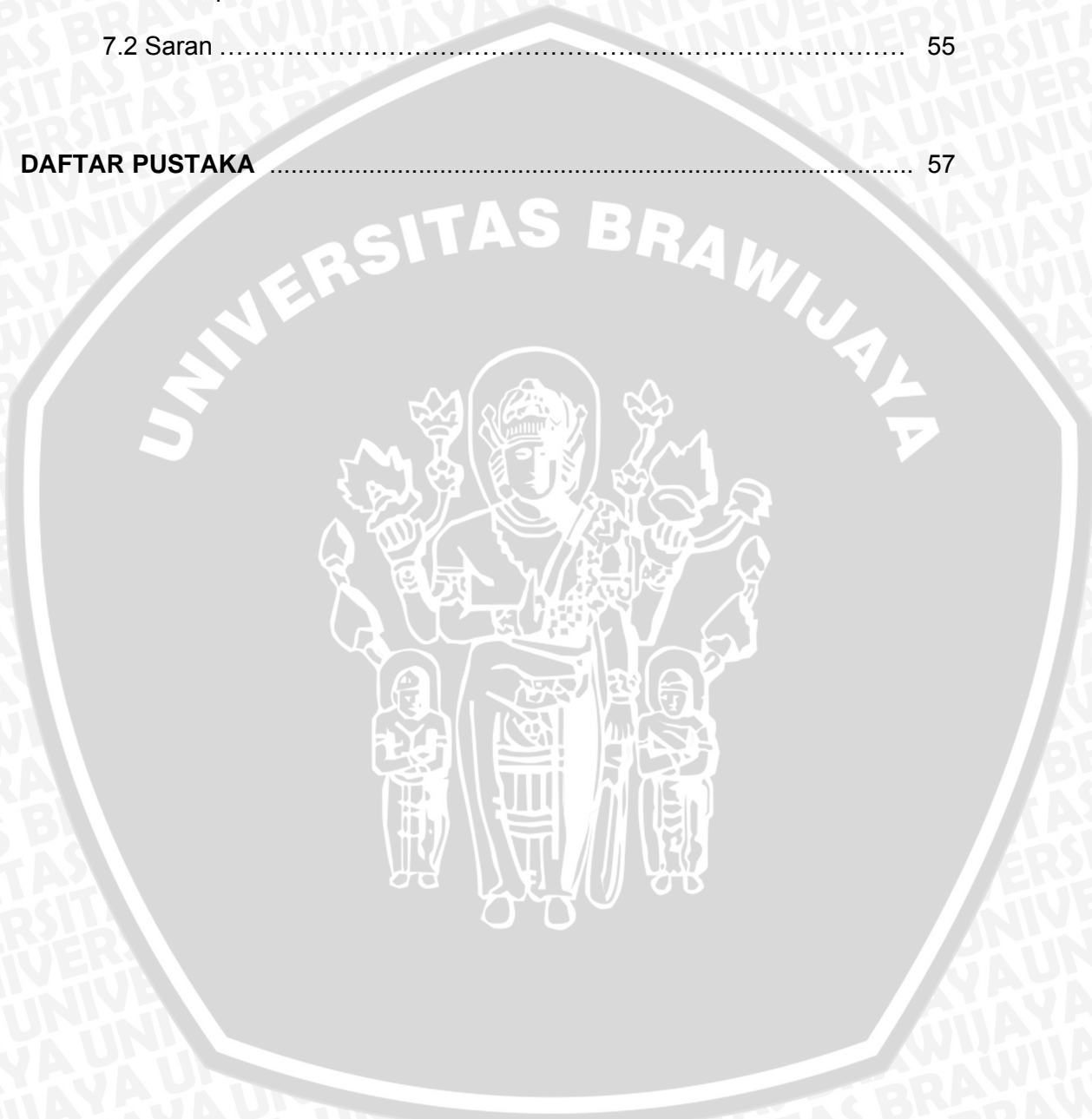
5.1	Hasil Identifikasi <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	37
5.2	Hasil Ekstrak Rimpang Temu Kunci ( <i>Boesenbergia pandurata</i> (Roxb.) Schlech) .....	39
5.3	Hasil Penelitian Pendahuluan .....	39
5.4	Hasil Uji Efektifitas Antibakteri dengan Penentuan Nilai KHM .....	41
5.5	Hasil Uji Efektifitas Antibakteri dengan Penentuan Nilai KBM .....	42
5.6	Analisis Data .....	46
5.6.1	Uji <i>One-Way</i> Anov .....	46
5.6.2	Uji Korelasi-Regesi .....	48

<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	<b>50</b>
-------------------------------	-----------

**BAB 7 KESIMPULAN dan SARAN**

7.1 Kesimpulan ..... 55  
7.2 Saran ..... 55

**DAFTAR PUSTAKA** ..... 57



## ABSTRAK

Arini, Fariza Rismaditta. 2014. **Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK (K). (2) drg. Nenny Prasetyaningrum, M.Ked.

*Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri penyebab terjadinya infeksi, salah satunya adalah infeksi saluran akar gigi. Infeksi saluran akar yang tidak dirawat dapat menyebabkan kematian gigi. Sebagai alternatif pengobatan untuk mengatasi infeksi tersebut, banyak dikembangkan antibakteri yang berasal dari tanaman herbal. Rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) diketahui sebagai tanaman herbal yang memiliki zat antibakteri berupa minyak atsiri, flavonoid, tannin, dan saponin. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang dilakukan menggunakan metode dilusi tabung. Kelompok perlakuan yaitu kelompok bakteri yang diberi ekstrak rimpang temu kunci dengan konsentrasi 9%, 11%, 13%, 15%, dan 17%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Kadar Hambat Minimal (KHM) tidak dapat diamati, sedangkan Kadar Bunuh Minimal (KBM) diperoleh pada konsentrasi 17%. Hasil uji statistic *One-Way* Anova menunjukkan bahwa perubahan tingkat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci memberikan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* dengan angka signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ). Uji korelasi Pearson menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci, maka semakin rendah jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu ekstrak rimpang temu kunci memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*, dengan KBM 17%.

Kata kunci: ekstrak rimpang temu kunci, *Streptococcus pyogenes*, antibakteri.

## ABSTRACT

Arini, Fariza Rismaditta. 2014. **The Antibacterial Effectivity Test of Fingerroot Extract (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) against *Streptococcus pyogenes* using *In Vitro* Method**. Final

Assignment, Dentistry Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK (K). (2) drg. Nenny Prasetyaningrum, M.Ked.

*Streptococcus pyogenes* is bacteria that causes infections disease, one of the infection is root canal infection. Root canal infections which doesn't get treatment can caused the tooth necrosis. In order to eliminate that infection, antibacterial agents are developed including those of herbal origins. Fingerroot is claimed as herbal origin which contains antibacterial agents such as atsiri oil, flavonoid, tannin, and saponin. The purpose of this research is to prove that the fingerroot extract have an antibacterial effect to against *Streptococcus pyogenes* using *in vitro* method. This research was conducted using a laboratory experimental tube dilution method. The treated groups are bacteria which are given the fingerroot extract with range of concentration as follows: 9%, 11%, 13%, 15%, and 17%. The result indicated that minimal inhibitory concentration (MIC) can't be found and minimal bactericidal concentration (MBC) is found at 17%. Results of statistical test *One-way* Anova showed that the changes of concentration of fingerroot extract provide a significant difference on the growth of *Streptococcus pyogenes* with significance numbers of 0.000 (  $p < 0.05$  ). Pearson correlation test showed that the higher concentration of fingerroot extract, the less number of colony growth. The conclusion of this study is fingerroot extract has antibacterial effect against *Streptococcus pyogenes* using *in vitro* method, with MBC at 17%.

Keywords: fingerroot extract, *Streptococcus pyogenes*, antibacterial.



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Dewasa ini kesehatan gigi dan rongga mulut merupakan bagian dari kesehatan tubuh yang tidak dapat dipisahkan satu dengan yang lainnya. Penyakit gigi dan mulut yang sering diderita masyarakat utamanya berawal dari karies yang tidak dirawat sehingga kerusakannya dapat berlanjut menjadi infeksi dan peradangan. Salah satu infeksi pada rongga mulut yang paling banyak menimbulkan masalah adalah infeksi yang terjadi pada saluran akar gigi (infeksi endodonti) (Rahardjo, 2008).

Infeksi saluran akar merupakan infeksi polimikroba karena di dalam ruang pulpa selain ditemukan virus dan jamur juga ditemukan bakteri (Walton dan Torabinejad, 2008). Hasil studi menjelaskan bahwa 80-90% infeksi saluran akar disebabkan oleh bakteri gram positif dengan predominan bakteri anaerob fakultatif (Brooks *et al.*, 2007). Salah satu bakteri penyebab utama infeksi saluran akar adalah *Streptococcus pyogenes* dengan prevalensi sebesar 16,5% (Al-Hamdani *et al.*, 2011). Bakteri ini merupakan flora normal yang mudah ditemukan dalam tubuh, terutama di kulit dan membran mukosa.

*Streptococcus pyogenes* menyusun sekitar 25% dari keseluruhan flora normal rongga mulut dan berpotensi menimbulkan inflamasi akut lanjutan dari pulpitis (Jalali, 2011). Selain itu bakteri ini banyak dihubungkan dengan insidensi

terjadinya beberapa penyakit, seperti *cellulitis*, *tonsilitis*, *pharyngitis*, *scarlet fever*, *endocarditis* akut serta infeksi supuratif lainnya (Todar, 2008).

Berbagai upaya telah dilakukan sebagai alternatif pengobatan infeksi saluran akar, salah satunya adalah dengan melakukan perawatan saluran akar (Tronstad, 2003). Prosedur penting dalam perawatan saluran akar adalah sterilisasi, dalam dunia kedokteran gigi prosedur ini dilakukan dengan menggunakan obat-obatan farmakologis yang relatif mahal. Dewasa ini, penggunaan tanaman obat sebagai alternatif pengobatan berbagai penyakit telah mengalami peningkatan, hal ini dikarenakan obat tradisional umumnya tidak menimbulkan efek samping serius, murah, dan aman untuk dikonsumsi. Salah satu tanaman obat tersebut adalah rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) (Harlianti, dkk., 2011).

Rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) merupakan tanaman semak kelompok *Zingiberaceae* yang banyak dimanfaatkan sebagai bumbu pada masakan (Harlianti, dkk., 2011). Dari aktivitas biologi yang telah diteliti, rimpang temu kunci memiliki potensi sebagai anti inflamasi, obat sariawan, antibakteri, obat gangguan perut dan lambung, serta obat penyakit kulit (Rukmana, 2004). Rimpang temu kunci diketahui mengandung berbagai zat aktif, yaitu minyak atsiri, flavonoid, saponin, dan tannin (Utami, 2012; Tulle, 2006).

Minyak atsiri bekerja melalui interaksi dengan membran sel bakteri, yang akan meningkatkan permeabilitas membran sel. Sedangkan flavonoid berfungsi untuk melindungi dari radikal bebas, anti peradangan, anti virus, dan antibakteri (Krisnawati, 2008). Senyawa tannin memiliki aktivitas antibakteri dengan cara

mengkerutkan dinding sel dan membran sel bakteri sehingga akan mengganggu permeabilitas sel bakteri (Juliantina *dkk.*, 2007). Selain ketiga senyawa diatas saponin pada rimpang temu kunci berpotensi mendekstruksi membran sel bakteri (Yunita, 2010).

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak rimpang temu kunci telah dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan KBM 7% dan KHM 6% (Tulle, 2006). Ekstrak rimpang temu kunci juga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* dengan KBM 2% dan *Streptococcus hemolytic  $\alpha$  non pneumoniae* dengan KBM 3% (Harlianti *dkk.*, 2011). Selain itu berbagai aktivitas antibakteri ditunjukkan oleh ekstrak rimpang temu kunci terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, dan *Actinomyces viscosus* (Chong *et al.*, 2012). Oleh karena belum ada publikasi tentang potensi ekstrak rimpang temu kunci sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektifitas antibakteri ekstrak rimpang temu kunci terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) *Schlech*) memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro* ?

### 1.3 Tujuan

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efektifitas antibakteri ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.
- b. Untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.
- c. Untuk mengetahui hubungan penambahan konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Bagi Institusi Pendidikan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pengetahuan dan memberikan informasi bagi dunia pendidikan tentang pengaruh ekstrak rimpang temu kunci sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

#### 1.4.2 Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif pengobatan dengan menggunakan herbal (rim pang temu kunci) yang murah, mudah, dan aman bagi masyarakat terhadap manifestasi penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pyogenes* serta dapat digunakan lebih lanjut sebagai alternatif bahan obat sterilisasi saluran akar yang murah dan mudah didapatkan.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Infeksi Saluran Akar

Infeksi saluran akar adalah peradangan pada pulpa gigi yang bersifat *irreversible* dan menjalar sampai saluran akar gigi (Ingle *et al.*, 2002). Penyebab utama infeksi ini didominasi oleh bakteri anaerob dan bakteri fakultatif anaerob (Walton & Torabinejad, 2008). Bakteri tersebut dapat menyerang pulpa gigi melalui beberapa cara, diantaranya melalui karies yang terbuka, trauma pada gigi, dan poket periodontal (Qualtrough *et al.*, 2005). Salah satu yang paling sering terjadi adalah infeksi saluran akar yang disebabkan oleh karies yang terbuka, hal ini akan mengakibatkan terbukanya tubulus dentin dan bakteri patogen karies tersebut dapat menjalar sepanjang sistem saluran akar sampai pada permukaan sementum apikal akar. Bila keadaan ini dibiarkan terus-menerus tanpa perawatan maka akan menyebabkan inflamasi akut yang berakhir pada kematian gigi (Queiroz, 2009).

#### 2.2 Mikrobiologi Saluran Akar

Infeksi saluran akar merupakan infeksi polimikroba yang disebabkan oleh adanya bakteri, virus, dan jamur pada saluran akar (Krompti, 2002; Rani *et al.*, 2000). Hasil penelitian menyebutkan bahwa 80-90% penyebab infeksi

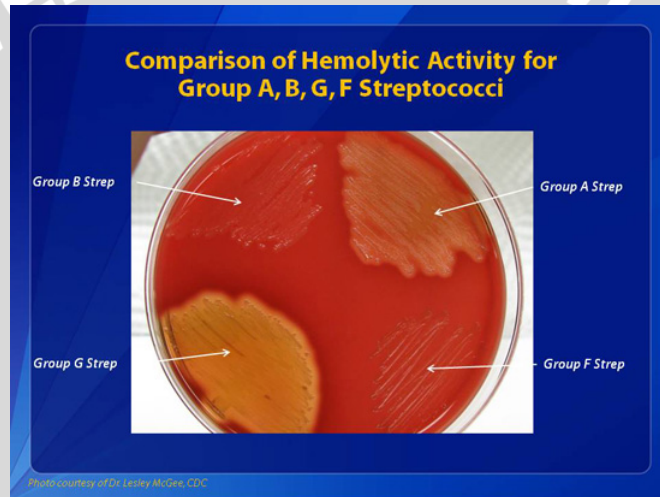
saluran akar adalah bakteri gram positif fakultatif anaerob *Streptococcus* (Brooks *et al.*, 2007; Bender, 2003). Selain itu ditemukan pula bakteri ditemukan pula *Prevotella*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, dan *Actinomyces* (Ingle *et al.*, 2002).

### 2.2.1 Bakteri *Streptococcus*

*Streptococcus* adalah bakteri gram positif yang mempunyai karakteristik yaitu dapat membentuk pasangan (berantai) dalam pertumbuhannya. Bakteri ini tersebar di alam dan berbentuk bulat atau lonjong dengan diameter sekitar 0,8-1,0  $\mu\text{m}$ . Beberapa *Streptococcus* merupakan anggota flora normal rongga mulut, sedang *Streptococcus* yang lain banyak dikaitkan dengan penyakit infeksi pada manusia. Bakteri ini termasuk mikroorganisme gram positif, tidak bergerak, tidak berspora, dan pada beberapa spesies membentuk kapsul. Sebagian besar *Streptococcus* bersifat fakultatif yang mempunyai arti bahwa mikroorganisme ini dapat tumbuh dalam keadaan dengan oksigen maupun tanpa oksigen (Brooks *et al.*, 2007; Forbes *et al.*, 2007).

*Streptococcus* dapat tumbuh dengan baik pada *enriched medium*, yaitu medium yang mengandung darah, serum misalnya cairan asites dengan pH 7,4-7,6, dan suhu optimal 37°C. Sebagian *Streptococcus* mati pada suhu panas sebesar 55°C selama 10 menit. Semua spesies *Streptococcus* akan mati pada suhu minimal 60°C selama  $\pm$  30-60 menit, seperti pada pasteurisasi 62°C selama ½ jam. Reaksi bakteri ini terhadap bahan kimia dapat diketahui dalam kurun waktu kurang lebih 15 menit, yaitu dalam tingtur

iodium, fenol 1/200, kresol 1/75, merkurokrom 2%, dan heksilresorsinol 1/1000. Sedangkan terhadap obat-obatan, *Streptococcus* peka terhadap sulfonamide, dan penisilin (Dzen *dkk.*, 2003).



**Gambar 2.1** *Streptococcus* pada *Blood Agar Plate* ([www.cdc.gov/groupbstrep/lab/lab-photos.html](http://www.cdc.gov/groupbstrep/lab/lab-photos.html))

Keterangan: perbedaan pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes* pada media *blood agar plate* menunjukkan hasil yang berbeda berdasar pada kemampuannya dalam reaksi hemolisa darah

*Streptococcus* berdasarkan kemampuannya dalam reaksi hemolisa darah pada *blood agar* dibedakan menjadi tiga kelompok, yaitu sebagai berikut (Brooks *et al.*, 2007):

a. *Streptococcus α Hemolytic*



Dikenal sebagai *Streptococcus viridans*. Yang termasuk dalam jenis ini adalah *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*.

b. *Streptococcus*  $\beta$  Hemolytic

Menghasilkan suatu daerah hemolisa yang jernih sekitar koloni, yang termasuk dalam jenis ini adalah *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*.

c. *Streptococcus*  $\gamma$  Hemolytic

Tidak menghasilkan daerah hemolisa di sekitar koloni pada media *blood agar*, yang termasuk dalam jenis ini adalah *Streptococcus bovis*, *Streptococcus faecalis* yang merupakan parasit intestinal.

### 2.2.2 *Streptococcus pyogenes*

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ferreti (2007) *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri yang termasuk dalam kingdom *Bacteria*, filum *Firmicutes*, kelas *Bacillus* dan ordo *Lactobacilales*. Selain itu dalam penelitiannya Ferreti (2007) juga mengemukakan bahwa *Streptococcus pyogenes* termasuk dalam famili *Streptococcaceae*, genus *Streptococcus* serta spesies *Streptococcus pyogenes*.

#### 2.2.2.1 Morfologi dan Karakteristik *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* adalah mikroorganisme anaerob fakultatif yang mempunyai bentuk bulat, berantai dengan diameter 0,5-1  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini merupakan bakteri gram positif grup A yang bersifat  $\beta$ -Hemolytic dan dapat memproduksi asam laktat. Habitat *Streptococcus pyogenes* utamanya ditemukan pada kulit, mukosa dan saluran pernafasan. Bakteri ini mengkomposisi 25% dari keseluruhan flora normal rongga mulut (Todar, 2008). Selain itu *Streptococcus pyogenes* dapat ditemukan pada *dental plaque* dan membran mukosa yang mengalami ulserasi dan bulla (Vichayanrat dkk., 2005)



Gambar 2.2 *Streptococcus pyogenes* pada Pewarnaan Gram (Schwan, 2007)

Keterangan: koloni *Streptococcus pyogenes* pada pewarnaan gram menunjukkan koloni berwarna ungu, bulat, dan berantai.

*Streptococcus pyogenes* adalah flora normal rongga mulut yang dapat tumbuh dengan baik pada media yang diperkaya (*enriched medium*) seperti medium darah, serum, dan transudat. Media ini perlu ditambahkan CO<sub>2</sub> sebesar 10% dan dieramkan selama 48 jam pada temperatur 37°C dengan pH sebesar 7,4-7,6. Sebagai golongan *Streptococcus* grup A, pada *blood agar plate* bakteri ini menunjukkan zona hemolisis yang translusen. Hemolisis ini disebabkan karena pada *Streptococcus pyogenes* terdapat kandungan enzim hemolisin dalam streptolisin O dan streptolisin S yang bersifat nonantigenik (Dzen *dkk.*, 2003). Pada pengecatan gram tampak sebagai gram positif yang mempunyai sel berderet seperti rantai, berbentuk bulat atau lonjong, non motil, dan tidak berspora (Samaranayake, 2002).



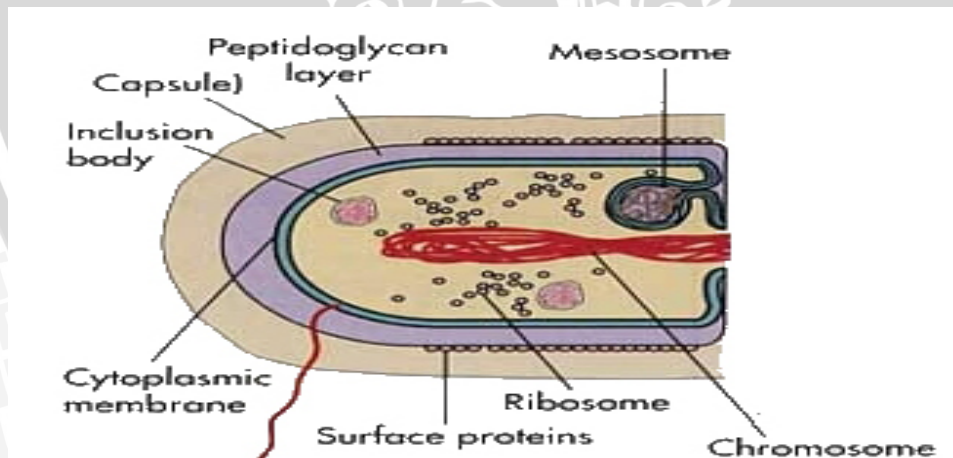
Gambar 2.3 *Streptococcus pyogenes* pada Blood Agar Plate (Gupte, 2012)

Keterangan: koloni *Streptococcus pyogenes* pada blood agar plate ditunjukkan dengan zona translusen pada blood agar plate.

### 2.2.2.2 Penentu Patogenitas dan Toksin *Streptococcus pyogenes*

Bakteri *Streptococcus pyogenes* menghasilkan sejumlah enzim dan eksotoksin yang dapat menentukan tingkat patogenitas bakteri ini yaitu:

- a. Hyaluronidase, berfungsi menyerang materi-materi yang menyatukan jaringan ikat sehingga akan meningkatkan permeabilitas bakteri
- b. Streptokinase, enzim proteolitik yang dapat melakukan lisis terhadap fibrin
- c. Hemolisin
- d. DNase, yang berfungsi merusak DNA seluler (Samaranayake, 2006) .



Gambar 2.4 Struktur Bakteri *Streptococcus pyogenes* (Murray, 2002)

Struktur bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah (Samaranayake, 2006) :

- a. *Capsule*

Merupakan lapisan yang terdapat di sekeliling bakteri, lapisan ini tersusun dari polisakarida dan protein. Peranan *capsule* bagi bakteri adalah sebagai media perlekatan pada *host* dan menghambat fagositosis.

b. *Peptidoglycan layer* atau dinding sel

*Streptococcus pyogenes* memiliki dinding sel yang tebal dan berlapis-lapis. Dinding sel bakteri ini tersusun dari *peptidoglycan* yang merupakan gabungan dari peptid dan gula (*glycan*).

c. *Cytoplasmic membrane*

Merupakan lapisan yang lebih dalam yang terdapat di dalam lapisan *peptidoglycan* pada dinding sel. *Cytoplasmic membrane* tersusun dari dua lapisan *phospolipid*. Membran ini berfungsi sebagai media transportasi berbagai molekul penting ke dalam sel inti bakteri, sekresi enzim dan racun, serta membantu sintesis dinding sel. Di dalam *cytoplasmic membrane* terdapat beberapa komponen penting, yaitu:

1. *Mesosome*, yang berfungsi untuk membantu pembelahan sel.
2. *Cytoplasma*, terdiri dari inti sel atau DNA yang dikelilingi oleh matriks yang mengandung *ribosomes*, *nutrient granules*, zat metabolik, dan berbagai ion.
3. *Nuclear material* atau *nucleoid*, DNA bakteri tersusun dari kromosom tunggal, kromosom sirkular, dan kromosom *supercoiled* yang mengandung sekitar 2000 gen dengan panjang kira-kira satu millimeter

dalam bentuk lurus. Pada saat pembelahan sel, inti sel tersebut mengalami replikasi ke dua arah yang saling berlawanan.

4. *Ribosomes*, merupakan tempat sintesa protein.
5. *Inclusion body*, lapisan di dalam *cytoplasma* yang mengandung berbagai sumber cadangan energi bagi bakteri

### 2.3 Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech)

Rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) adalah tanaman yang termasuk dalam kingdom *Plantae*, subkingdom *Tracheobionta*, superdivisi *Spermatophyta*, divisi *Magnoliophyta* (berbunga), kelas *Liliopsida*, ordo *Zingiberales*, family *Zingiberaceae*, genus *Boesenbergia*, dan species *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlechter (Utami, 2012).

#### 2.3.1 Morfologi Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech)

Tanaman ini merupakan tanaman berumur tahunan yang memiliki tinggi sekitar 30-100 cm. Daunnya berbentuk bulat meruncing ke ujung dan pangkal, berwarna hijau, licin dan beralur. Bunga temu kunci biasanya keluar saat tumbuhan berumur tua, bunganya berbentuk tabung, tumbuh tegak dengan bagian atas melengkung. Bagian dari temu kunci yang sering dimanfaatkan masyarakat secara luas adalah rimpang tanaman, rimpang temu kunci tumbuh di bawah permukaan secara mendatar, beruas, sedikit keras, bersisik tipis dan berbau harum sedangkan anakan rimpang

menggerombol kecil di sebelah rimpang induk serupa rangkaian anak kunci (Harmanto, 2007).

Rimpang yang memiliki rasa manis getir dengan aroma khas menyegarkan ini mudah ditemukan di seluruh daerah Indonesia dan Asia karena tanaman ini umumnya dapat tumbuh liar di daerah yang tidak tergenang air dan terkena sinar matahari langsung (Harmanto, 2007).



Gambar 2.5 Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) (Chong dkk., 2012).



Gambar 2.6 Tanaman Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech)  
(Chong dkk., 2012).

### 2.3.2 Kandungan Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech)

Menurut penelitian pendahulu oleh Utami dan Chong *et al.*, (2012) kandungan rimpang temu kunci adalah minyak atsiri, saponin, flavonoid, dan tannin.

#### 2.3.2.1 Minyak Atsiri

Minyak atsiri merupakan minyak yang mudah menguap dan dapat diperoleh dengan cara penyulingan. Minyak atsiri biasanya tidak berwarna tetapi setelah mengalami proses oksidasi dan penderaman warnanya berubah lebih gelap (Nurhayati, 2010; Wijaya, 2011).

Cara kerja minyak atsiri sebagai antibakteri adalah dengan menghambat proses terbentuknya dinding sel bakteri. Senyawa fenol pada minyak atsiri bila berinteraksi dengan dinding sel mikroorganisme dapat menyebabkan terganggunya permeabilitas dan menyebabkan terjadinya denaturasi protein. Protein yang mengalami denaturasi dapat menyebabkan hilangnya aktivitas fisiologis bakteri sehingga menghambat pertumbuhan sel dan kemudian sel menjadi rusak (Sanjaya, 2007).

#### 2.3.2.2 Saponin

Saponin merupakan suatu glikosida yang terkandung dalam berbagai macam tanaman (Febianti, 2010). Senyawa golongan terpenoid ini



mempunyai sifat berasa pahit, berbusa dalam larutan air, menghemolisa eritrosit, dan berat molekul yang relatif tinggi. Berdasarkan struktur kimia, senyawa saponin dapat dikelompokkan menjadi 3 macam yaitu: *quillage saponin*, *alfalfa saponin*, dan *soy bean saponin*, ketiga macam kelompok ini bisa terdapat pada satu tumbuhan (Febianti 2010).

Senyawa saponin merupakan fitokimia yang berguna sebagai antifungi dan antibakteri berspektrum luas. Pada studi laboratorium dikemukakan bahwa mekanisme saponin sebagai antibakteri didapatkan melalui kemampuan gugus lipofiliknya dalam merusak membran sel intrerna bakteri (retikulum endoplasma dan badan golgi) (Yunita, 2010). Selain itu saponin juga diketahui dapat berinteraksi dengan gugus lipid pada membran bakteri. Kerusakan membran sel tersebut bila terjadi terus-menerus akan menimbulkan gangguan pada permeabilitas sel bakteri sehingga bakteri tidak dapat melakukan aktivitas hidup, hal ini akan berakibat pada terhambatnya pertumbuhan serta kematian bakteri (Bruneton, 2008).

### **2.3.2.3 Flavonoid**

Flavonoid merupakan suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, biru, ungu, dan kuning. Flavonoid yang ditemukan pada tumbuhan adalah zat warna kuning. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon (Bakti, 2010).

Aktivitas flavonoid sebagai antibakteri dilakukan dengan cara merusak dinding sel yang terdiri atas lipid dan asam amino yang akan bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri. Selanjutnya senyawa ini akan berkontak dengan DNA bakteri, karena adanya perbedaan kepolaran lipid DNA dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid maka terjadi kerusakan struktur lipid dari DNA yang akan mengakibatkan bakteri lisis (Gunawan, 2009).

Senyawa flavonoid mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga terjadi denaturasi protein dan asam nukleat. Denaturasi tersebut menyebabkan koagulasi protein dan mengganggu integritas membran dan fungsi fisiologis bakteri. Metabolisme yang terganggu akan mengakibatkan rusaknya sel secara permanen karena tidak tercukupinya kebutuhan energi (Agustin, 2007).

#### **2.3.2.4 Tannin**

Tannin merupakan senyawa fenolik yang mempunyai karakteristik berupa cincin aromatik dengan satu atau dua gugus hidrosil kompleks yang memiliki berat molekul 500-3000 (Hermawan *dkk.*, 2003). Tannin sendiri dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan tipe struktur serta aktivitasnya terhadap senyawa hidrolitik terutama asam yaitu: tanin terkondensasi dan tanin yang dapat dihidrolisis (Pambayun, 2007).

Tannin memiliki aktivitas antibakteri dimana toksisitas senyawa tannin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa *astringent* yang terdapat pada tannin dapat menginduksi pembentukan ikatan senyawa kompleks terhadap enzim atau substrat bakteri serta membentuk kompleks ikatan tannin terhadap ion logam yang dapat menambah daya antibakteri tannin itu sendiri (Akiyama,2001).

Selain itu juga dapat mengkerutkan dinding sel sehingga mengganggu permeabilitas sel bakteri. Akibat terganggunya permeabilitas sel bakteri tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya dapat terhambat bahkan mati (Juliantina, 2007).

#### 2.4 Aktivitas Farmakologi

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) telah dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan KBM 7% dan KHM 6% (Tulle, 2006). Selain pada *Staphylococcus aureus* ekstrak rimpang temu kunci juga telah dibuktikan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* dengan KBM 2% dan *Streptococcus hemolytic a non pneumoniae* dengan KBM 3% (Harlianti dkk., 2011).

Berdasarkan penelitian terdahulu menyebutkan bahwa ekstrak rimpang temu kunci juga menunjukkan adanya daya antibakteri yang besar

terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, dan *Actinomyces viscosus* (Chong dkk., 2012).

## 2.5 Antibakteri

Antibakteri adalah bahan yang dapat menghambat atau menghentikan pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme, khususnya bakteri. Berdasarkan sifatnya antibakteri dibagi menjadi dua kelompok, yaitu antiseptik dan desinfektan. Antiseptik adalah bahan yang berfungsi untuk menghambat perkembangan bakteri (bakteriostatik), sedangkan desinfektan adalah bahan yang berfungsi untuk menghambat serta membunuh bakteri dengan cara menghancurkan dinding selnya (bakteriosidik) (Katzung, 2001). Bahan antibakteri yang baik merupakan bahan yang efektif membunuh bakteri tetapi tidak mengiritasi jaringan sekitarnya. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri *in vitro*, yaitu: waktu inkubasi, stabilitas obat, pH lingkungan, suhu komponen media, aktivitas metabolik bakteri, dan ukuran inokulum (Tanu, 2007).

KHM atau Kadar Hambat Minimum adalah kadar minimal suatu zat yang diperlukan untuk menghambat perkembangbiakan mikroorganisme, ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan atau endapan pada tabung yang berisi inokulum bakteri dalam metode dilusi tabung. Sedangkan KBM atau Kadar Bunuh Minimum adalah kadar minimal suatu zat yang diperlukan untuk membunuh mikroorganisme, hal ini ditunjukkan dengan tidak ditemukannya

pertumbuhan bakteri atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (Setiabudy, 2009; Dzen, 2003).

Salah satu mekanisme kerja bahan antibakteri adalah dengan cara mendenaturasi protein, yaitu (Tanu, 2007):

- a. Merusak molekul asam nukleat dan protein sehingga pada akhirnya akan berakibat kerusakan sel secara permanen.
- b. Merusak dinding sel bakteri, yaitu dengan cara mengubah struktur dinding sel setelah dibentuk atau bahkan menghambat pembentukan dinding sel.
- c. Mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yaitu dengan cara merusak membran sitoplasma yang berakibat terganggunya aliran keluar masuk bahan-bahan serta rusaknya integritas komponen seluler.
- d. Menghambat kerja enzim, dengan mengganggu reaksi kimia yang melibatkan beberapa enzim dalam sel maka akan menyebabkan terganggunya metabolisme atau kematian sel.
- e. Menghambat sintesa protein dan asam nukleat.

## 2.6 Ekstraksi

Terdapat beberapa metode yang umum digunakan untuk mendapatkan senyawa-senyawa aktif antibakteri dalam tanaman, yaitu dengan cara dingin dan cara panas. Ekstraksi merupakan proses penarikan atau pemisahan suatu bahan aktif dari campurannya. Pelarut yang digunakan disesuaikan dengan bahan aktif yang diinginkan kemudian diuapkan hingga

mencapai kepekatan tertentu (Manan, 2008). Hasil dari ekstraksi disebut ekstrak, yaitu sediaan sari pekat tumbuhan yang diperoleh dengan cara melepaskan zat aktif dari tiap bahan dengan menggunakan pelarut atau *menstruum* yang sesuai, kemudian diuapkan dan selanjutnya serbuk atau sisa endapan diatur untuk ditetapkan standarnya (Ansel, 2008).

Air dan etanol merupakan pelarut yang sering digunakan dalam ekstraksi, karena banyak bahan aktif dari tumbuhan yang dapat larut dalam etanol atau air sehingga etanol atau air menjadi acuan cairan pengekstraksi (Charuniza, 2012).

Etanol dipilih sebagai pelarut karena sifatnya lebih selektif, lebih sedikit membutuhkan panas, dapat bercampur dengan air, tidak beracun, dan netral absorpsi yang baik. Campuran etanol dan air biasanya digunakan untuk meningkatkan pelarutan (Gamse, 2002).

### **2.6.1 Metode Ekstraksi**

Beberapa metode yang digunakan untuk ekstraksi dengan pelarut, yaitu (Utami, 2012):

#### **a. Cara Dingin**

- Maserasi, yaitu proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Dengan metode ini, zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan dapat ditarik.

- Perkolasi, yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*), umumnya dilakukan pada suhu ruangan. Ekstraksi dengan metode ini membutuhkan pelarut yang lebih banyak.

#### b. Cara Panas

- Infusi, adalah sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15-20 menit.
- Dekoksi, yaitu infus yang dibuat dengan waktu lebih lama hingga temperaturnya mencapai 100°C.
- Soxhlet, yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru yang dilakukan dengan alat khusus.
- Reflux, yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut pada temperatur dan waktu tertentu dengan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan serta proses pendinginan balik. Pada Reflux dilakukan pengulangan sebanyak 3-5 kali sehingga termasuk proses ekstraksi sempurna.

### 2.7 Uji Antibakteri

Aktivitas antibakteri suatu bahan dapat diukur untuk menentukan kemampuan suatu bahan untuk melawan bakteri, mendeteksi mekanisme resistensi

bakteri, dan mengukur interaksi bahan dengan mikroorganisme. Terdapat dua cara yang digunakan menentukan aktivitas antibakteri (Forbes, 2007), yaitu:

### **2.7.1 Metode Dilusi**

Dalam metode dilusi diperlukan larutan antibakteri yang telah diencerkan melalui pengenceran seri, yaitu dengan mengencerkan bahan antibakteri dalam media cair sehingga akan didapatkan suatu larutan yang kadar konsentrasi berkelipatan setengah, dengan permisalan 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 µg/ml. Lalu pada setiap tabung dimasukkan 0,1 ml inokulum bakteri. Dua tabung disediakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol negatif berisi media tanpa inokulum bakteri, sedangkan untuk kontrol positif berisi inokulum bakteri dan media. Selanjutnya semua tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati kekeruhannya. Hambatan pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan adanya kejernihan pada tabung. Kemudian untuk melihat adanya pertumbuhan koloni bakteri hasil yang didapat dari setiap tabung ditanam pada media agar. Dengan metode dilusi tabung ini dapat ditentukan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM). Selain menggunakan tabung metode dilusi juga dapat dilakukan dengan menggunakan media padat (agar) (Bagg *et al.*, 2006).

### **2.7.2 Metode Difusi**

Metode difusi bertujuan untuk menguji efektifitas beberapa bahan antibakteri terhadap bakteri. Media padat diinokulasi dengan bakteri, pada



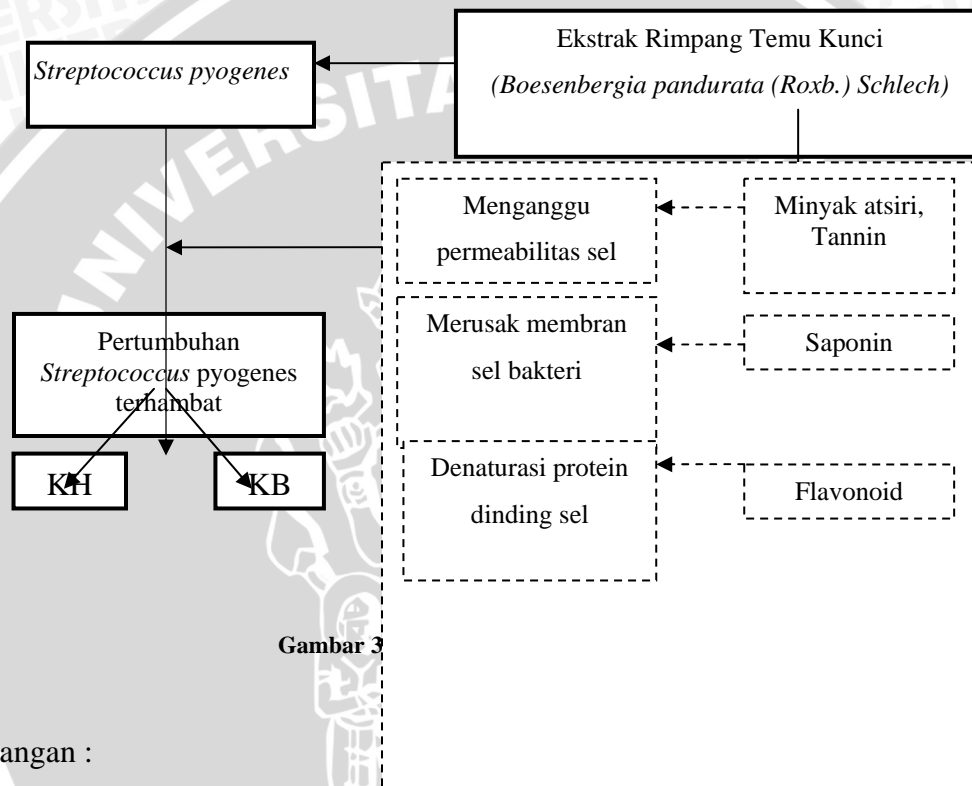
media tersebut dibuat sumuran lalu bahan antibakteri yang akan diujikan diletakkan pada sumuran kemudian diinkubasi, selanjutnya diamati adanya daerah hambatan di sekeliling tempat diletakkannya bahan antibakteri tersebut. Daerah atau zona hambatan itu yang menjadi indikator kepekaan bakteri uji terhadap bahan antimikroba (Kusmayati dan Agustini, 2007).

Selain itu pada metode difusi terdapat cara lain dalam mengevaluasi hasil uji kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri, yaitu cara *Kirby Bauer*. Cara ini dilakukan dengan membandingkan diameter zona hambat (area jernih) disekitar cakram yang telah diberi bahan antibakteri dengan tabel NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standart*). Dengan menggunakan tabel NCCLS dapat diketahui kriteria bakteri uji tersebut sensitif, sensitif intermediet, atau resisten terhadap bahan antibakteri yang digunakan (Dzen dkk., 2003).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3

Keterangan :

- : variabel yang diteliti
- : variabel yang tidak diteliti
- : menunjukkan

Dalam rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata (Roxb.) Schlech*) terdapat berbagai senyawa aktif yang bersifat sebagai bahan antibakteri. Untuk mendapatkan bahan aktif antibakteri tersebut, dapat diperoleh dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Bahan aktif antibakteri yang terkandung dalam rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata (Roxb.)* adalah, flavonoid, minyak atsiri, tannin,

dan saponin. Senyawa flavonoid mempunyai efek antibakteri melalui kemampuannya dalam mendenaturasi protein dinding sel. Sementara itu, kinerja minyak atsiri sebagai antibakteri adalah melalui interaksi dengan dinding sel bakteri, yang akan mengganggu permeabilitas membran sel. Hal ini akan menghambat pertumbuhan sel dan terjadinya kerusakan sel pada bakteri. Sedangkan senyawa aktif tannin yang berfungsi dalam pengkerutan dinding sel akan mengakibatkan terganggunya permeabilitas sel bakteri. Selain flavonoid, minyak atsiri, dan tannin, rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) juga mengandung senyawa aktif saponin yang memiliki potensi untuk merusak membran sel bakteri. Ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) kemudian diberikan pada bakteri *Streptococcus pyogenes*. Keadaan ini akan menyebabkan pertumbuhan bakteri tersebut terhambat dan dapat menyebabkan kematian bakteri, yang dinilai dari nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

## BAB 4

## METODOLOGI PENELITIAN

## 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorik dengan rancangan *true experiment-post test only control group design* yang menggunakan metode *tube dilution* untuk mengetahui pengaruh ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata (Roxb.) Schlech*) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.

## 4.2 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari isolat bakteri Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Besar sampel yang diperlukan dapat dihitung dengan menggunakan rumus pengurangan :

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 = 4 \quad (\text{Notobroto, 2005})$$

Keterangan :

$p$  = jumlah perlakuan (6 perlakuan, yaitu 5 konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci dan 1 kontrol bakteri)

$n$  = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan)

Berdasarkan rumus pengulangan diatas, dalam penelitian ini akan dilakukan 4 kali pengulangan.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech).

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*.

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juli-Desember 2013.

### 4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

#### 4.5.1 Bahan pembuatan ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech

Disiapkan 200 gram rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech dan etanol dengan kadar 96%.

#### **4.5.2 Alat pembuatan ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech)**

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak rimpang temu kunci antara lain: neraca analitik, oven maserator, gelas ukur, botol penampung, *rotary evaporator*, kertas saring *whatman*, dan corong *buchner*.

#### **4.5.3 Bahan identifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes***

Isolat bakteri *Streptococcus pyogenes*, safranin, lugol, kertas penghisap, kristal violet, minyak imersi, alkohol 96%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *aquadest*, kapas, *Blood Agar Plate* (BAP), *optochin disk*.

#### **4.5.4 Alat identifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes***

Objek gelas, spidol, spiritus, ose, tabung reaksi kosong steril, mikroskop, rak tabung reaksi, korek api.

#### **4.5.5 Bahan uji kepekaan ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes***

Isolat bakteri *Streptococcus pyogenes*, spektrofotometer, ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech), ose, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), inkubator, mikropipet 1 ml, *aquadest* steril, cawan petri, tabung reaksi steril, spiritus, *vortex*, rak tabung reaksi, *colony counter*.

#### 4.6 Definisi Operasional

- a. Ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) *Schlech*) merupakan proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut etanol 96% dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Dengan metode ini, zat-zat aktif yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan dapat ditarik hingga mendapatkan hasil berupa ekstrak kental. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi 9%, 11%, 13%, 15%, 17% yang didapatkan dengan metode pengenceran seri. Rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) *Schlech*) didapatkan dari Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur UPT Materia Medika Batu.
- b. Bakteri *Streptococcus pyogenes* dalam penelitian ini didapatkan dari isolat bakteri Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah dilakukan tes identifikasi bakteri.
- c. Kontrol positif penelitian ini, yaitu sediaan bakteri tanpa penambahan ekstrak rimpang temu kunci.
- d. Kontrol negatif penelitian ini, yaitu sediaan ekstrak rimpang temu kunci tanpa penambahan suspensi bakteri.
- e. Kadar hambat minimum (KHM), yaitu kadar atau konsentrasi terendah ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.)

*Schlech*) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji *Streptococcus pyogenes*. Penentuan konsentrasi kadar hambat minimum (KHM) didapatkan dengan melihat tabung yang jernih pada pengenceran tertinggi menggunakan metode pengenceran (dilusi tabung).

- f. Kadar bunuh minimum (KBM), yaitu kadar atau konsentrasi terendah ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) *Schlech*) yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri uji *Streptococcus pyogenes*. Hal ini ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan koloni bakteri pada medium atau pertumbuhan koloni bakteri kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (OI).

## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Persiapan

Alat-alat yang dapat disterilisasi, seperti tabung reaksi, erlenmayer, petridisk, dll disiapkan dalam kondisi steril terlebih dahulu. Proses sterilisasi dilakukan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 18 menit.

### 4.7.2 Tes Identifikasi Bakteri

- a. Identifikasi Bakteri dengan Tes Pewarnaan Gram



1. Tes pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri gram positif atau bakteri gram negatif.
2. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan di biarkan dingin.
3. Satu ose *aquadest* steril diteteskan pada objek ditambah sedikit biakan bakteri yang di ambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan pada gelas objek dan diratakan.
4. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
5. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet, dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan di tetesi dengan lugol selama 1 menit. Kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-6 detik atau sampai warna cat luntur. Kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
8. Sediaan ditetesi safranin selama 30 detik. Kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
9. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
10. Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x.

11. Hasil: positif *Streptococcus pyogenes* tercat ungu yang menunjukkan bahwa bakteri ini termasuk dalam gram positif.

b. Identifikasi Bakteri dengan Tes Katalase

1. Tes katalase bertujuan untuk membedakan bakteri dengan reaksi katalase negatif (*Streptococcus*) dengan bakteri dengan reaksi katalase positif (*Staphylococcus*).
2. Gelas objek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
3. Membuat sediaan pembedahan cairan bakteri pada gelas objek.
4. Sediaan ditetesi larutan  $H_2O_2$  3%.
5. Diamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi.
6. Hasil untuk *Streptococcus pyogenes* pada tes katalase adalah negatif dengan tidak terdapatnya gelembung udara.

c. Identifikasi Bakteri dengan Tes Cakram *Bacitracin*

1. Tes cakram *bacitracin* bertujuan untuk membedakan *Streptococcus* grup A dengan *Streptococcus* yang lain.
2. Melakukan *streaking* bakteri pada BAP
3. Meletakkan *bacitracin disk* di tengah inokulum dengan penjepit steril.

4. Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak sampai membenamkan disk dalam agar.
5. Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C di dalam inkubator.
6. Mengamati zona inhibisi disekeliling disk. Jika terdapat zona inhibisi maka hasil diidentifikasi sebagai *Streptococcus pyogenes*.

#### 4.7.3 Persiapan Suspensi Bakteri *Streptococcus pyogenes*

1. Penggunaan isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* dalam penelitian ini adalah dengan cara membuat suspensi koloni *Streptococcus pyogenes* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dengan media *Nutrient Broth* (NB).
2. Diambil 5 koloni ( $d \geq 1\text{mm}$ ) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NA. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada  $\alpha$  maksimal = 625 nm. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung  $1 \times 10^8$  CFU/mL dengan rumus  $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ .
3. Untuk mendapat suspensi sel yang mengandung  $0,5 \times 10^8$  hingga  $2,5 \times 10^8$  CFU/mL dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung  $10^8$  CFU/mL) untuk dicampur dengan 9 ml

NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi  $10^7$  CFU/mL. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi kuman yang digunakan untuk tes, yaitu  $0,5 \times 10^6$  hingga  $2,5 \times 10^6$  CFU/mL.

#### 4.7.4 Pembuatan ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech)

1. Rimpang temu kunci segar dicuci bersih lalu dikeringkan hingga benar-benar kering (diangin-anginkan dalam suhu ruangan) dipotong dan digiling halus sampai mendapatkan serbuk rimpang temu kunci sebanyak 200 gram.
2. Serbuk rimpang temu kunci dimasukkan ke maserator dan direndam dengan sesekali diaduk dalam etanol 96% selama 24 jam, kemudian disaring dengan corong *Buchner* dan kertas saring *whatman* sampai didapatkan filtrat yang terpisah dari ampasnya.
3. Perendaman dan penyaringan tersebut diulang sebanyak 6 kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama hingga warna maserat berubah dari coklat gelap menjadi kuning kecoklatan.
4. Kemudian, semua filtrat dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu  $50^{\circ}\text{C}$ .
5. Filtrat yang tersisa diuapkan dengan oven maserator pada suhu  $40-50^{\circ}\text{C}$  hingga didapatkan ekstrak kental.

6. Ekstrak rimpang temu kunci murni dimasukkan ke dalam botol steril, ditutup rapat, dan disimpan di tempat yang sejuk.

#### **4.7.5 Uji aktivitas antibakteri ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech terhadap *Streptococcus pyogenes***

1. Disediakan 6 tabung, steril yaitu: 5 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (kontrol bakteri), dan 1 tabung sebagai kontrol negatif (kontrol bahan).
2. Pembuatan konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci didapatkan dari metode pengenceran seri dengan cara perbandingan antara volume ekstrak dengan *aquadest*.
3. Pengenceran seri:

Tabung 1: diisi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci sejumlah 0,09 ml ditambahkan 0,91 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci 9%.

Tabung 2: diisi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci sejumlah 0,11 ml ditambahkan 0,89 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci 11%.

Tabung 3: diisi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci sejumlah 0,13 ml ditambahkan 0,87 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci 13%.

Tabung 4: diisi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci sejumlah 0,15 ml ditambahkan 0,85 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci 15%.

Tabung 5: diisi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci sejumlah 0,17 ml ditambahkan 0,83 ml *aquadest*, dicampur sampai didapat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci 17%.

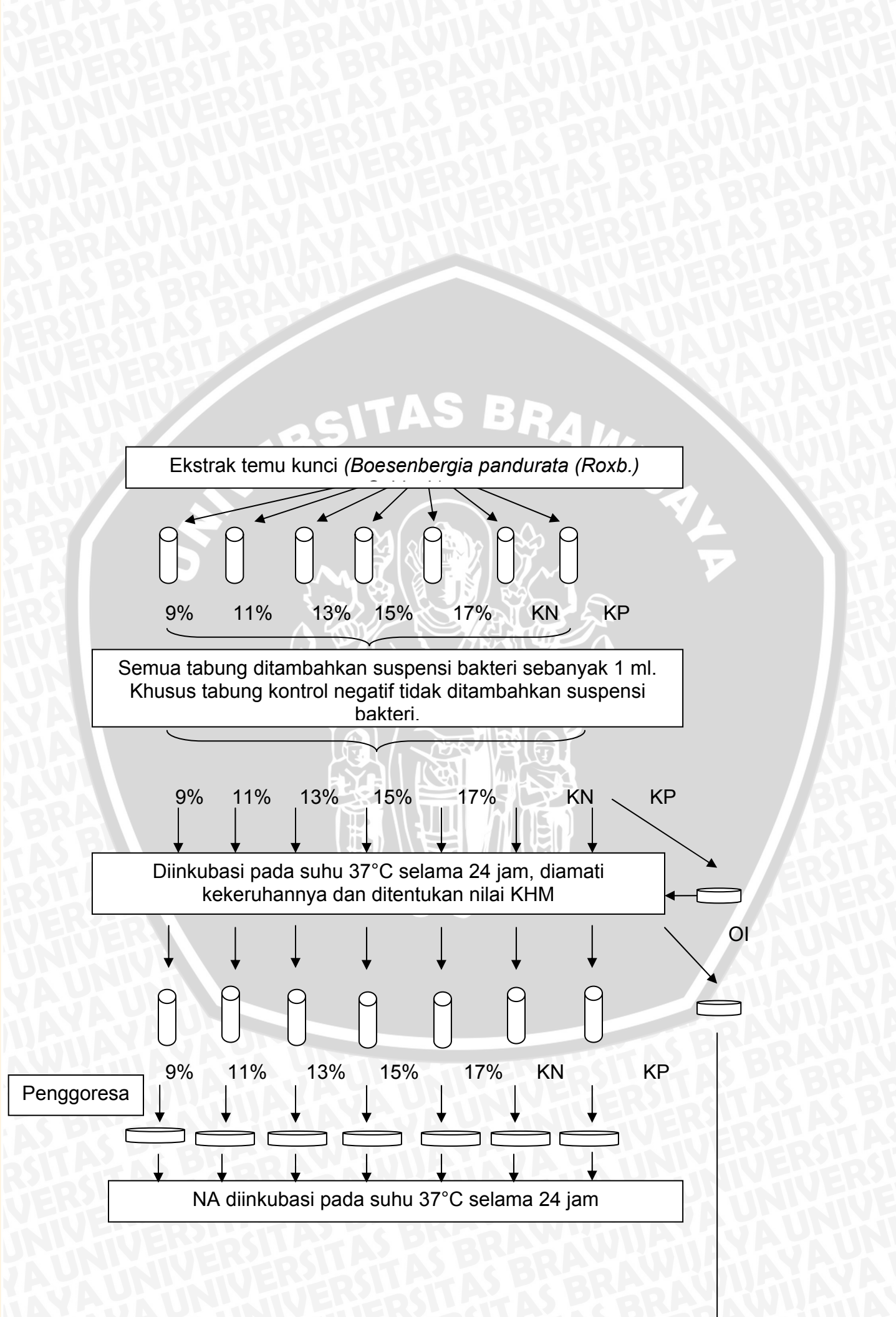
Tabung 6: diisi ekstrak rimpang temu kunci dengan konsentrasi 100% sebanyak 1 ml tanpa bakteri *Streptococcus pyogenes* (kontrol negatif).

Tabung 7: diisi bakteri *Streptococcus pyogenes* + *aquadest* tanpa penambahan ekstrak rimpang temu kunci (kontrol positif).

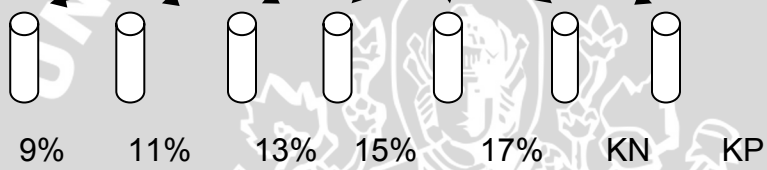
4. Kemudian perbenihan cair bakteri *Streptococcus pyogenes* dimasukkan ke dalam tabung 1 sampai 6, masing-masing sebanyak 1 ml inokulum standart (Mc. Farland 0,5).
5. Kontrol kuman (0%) digoreskan pada media *Nutrient Agar* (NA) sebagai *Original Inoculum*, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Semua tabung di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
7. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara mengamati kejernihan tabung dibantu

dengan latar belakang berupa garis hitam yang berbeda ketebalannya.

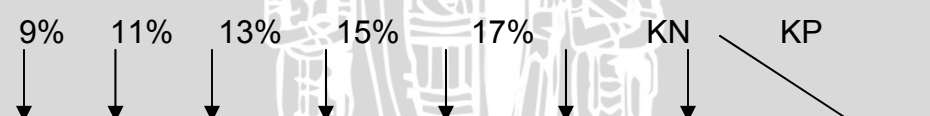
8. Kemudian untuk memperjelas hasil, dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose, lalu diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* (NA). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
9. Pada hari ketiga, hasil data KBM didapatkan dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing tabung konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dengan tidak adanya jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media *Nutrient Agar* (NA) atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *Original Inoculum*.



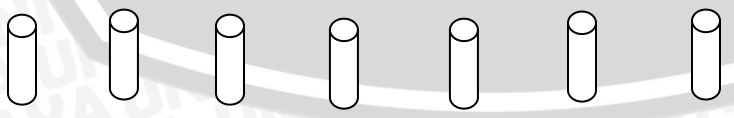
Ekstrak temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.)



Semua tabung ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml. Khusus tabung kontrol negatif tidak ditambahkan suspensi bakteri.



Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diamati kekeruhannya dan ditentukan nilai KHM

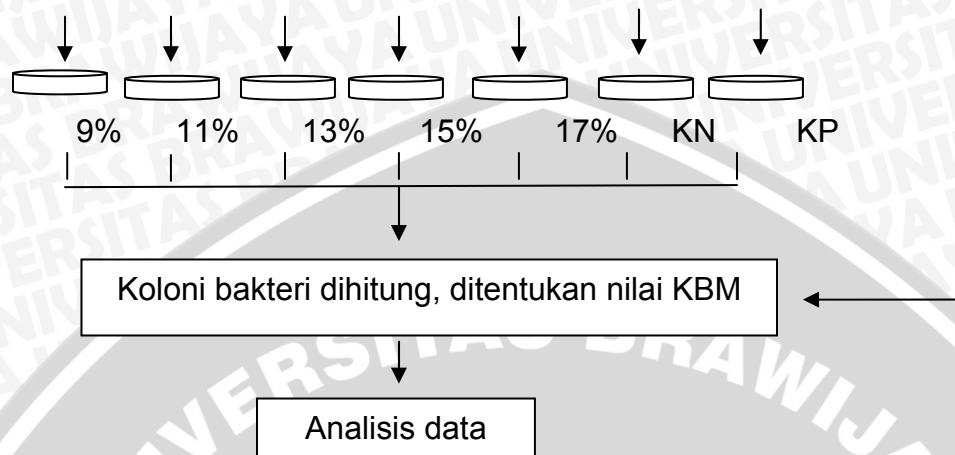


Penggoresan



NA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam





Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian

Keterangan :

KP = Kontrol positif (bakteri *Streptococcus pyogenes* ditambah *aquadest*, tanpa penambahan ekstrak rimpang temu kunci)

KN = Kontrol negatif (ekstrak rimpang temu kunci tanpa penambahan bakteri *Streptococcus pyogenes*)

#### 4.8 Analisis Data

Terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas pada data menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* dan dilakukan pengujian homogenitas data menggunakan uji *Levene Homogeneity Test*. Kemudian bila data terdistribusi normal dan homogen, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One Way Anova*. Uji statistik *One Way Anova* dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) ini digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata (Roxb.) Schlech*) terhadap pertumbuhan koloni

bakteri *Streptococcus pyogenes*. Apabila didapatkan nilai signifikansi  $p$  value  $\leq \alpha$  (0,05) maka hipotesis diterima, tetapi apabila  $p$  value  $> \alpha$  (0,05) maka hipotesis ditolak. Selanjutnya dilakukan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Analisis data ini menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 12.0.



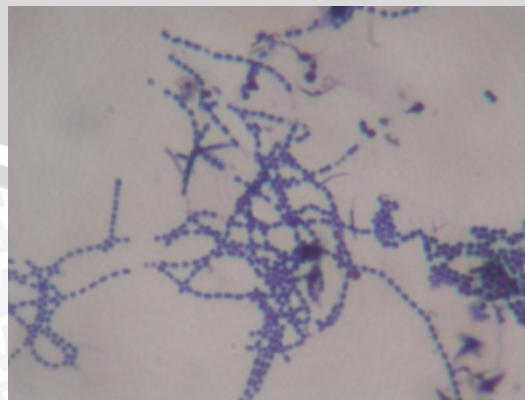
## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Identifikasi *Streptococcus pyogenes*

Isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelum bakteri digunakan, dilakukan identifikasi bakteri terlebih dahulu untuk memastikan bakteri tersebut adalah benar *Streptococcus pyogenes*. Isolat bakteri yang telah dikultur pada media NA (*Nutrient Agar*) diidentifikasi dengan uji pewarnaan gram, katalase, dan cakram *bacitracin*.

Koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada NA (*Nutrient Agar*) berbentuk bulat, berwarna putih, halus dan kadang bertumpuk. Pada pewarnaan gram dan dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x didapatkan gambaran koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* berwarna ungu yang berbentuk bulat lonjong dan berantai, seperti pada gambar 5.1.



**Gambar 5.1 Hasil Uji Pewarnaan Gram dengan Mikroskop Perbesaran 1000x**

Keterangan: hasil uji pewarnaan gram *Streptococcus pyogenes* menunjukkan koloni berwarna ungu, berbentuk bulat dan berantai.

Pada hasil tes katalase (gambar sebelah kiri), *Streptococcus pyogenes* menunjukkan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak terdapatnya gelembung udara saat perbenihan cair pada glass objek ditetesi dengan  $H_2O_2$  3%, seperti pada gambar 5.2.

**Gambar 5.2 Hasil Tes Katalase *Streptococcus pyogenes***

Keterangan: hasil tes katalase *Streptococcus pyogenes* (tanda panah) menunjukkan reaksi negatif (tidak ada gelembung udara)

Setelah pewarnaan gram dan katalase, identifikasi bakteri didasarkan pada uji cakram *bacitracin*. Hasil uji cakram *bacitracin* menunjukkan terdapatnya zona inhibisi disekeliling cakram *bacitracin*, seperti yang terlihat pada gambar 5.3.



**Gambar 5.3 Hasil Uji Cakram *Bacitracin Streptococcus pyogenes***

Keterangan: hasil tes cakram *bacitracin Streptococcus pyogenes* menunjukkan zona inhibisi disekitar cakram *bacitracin*.

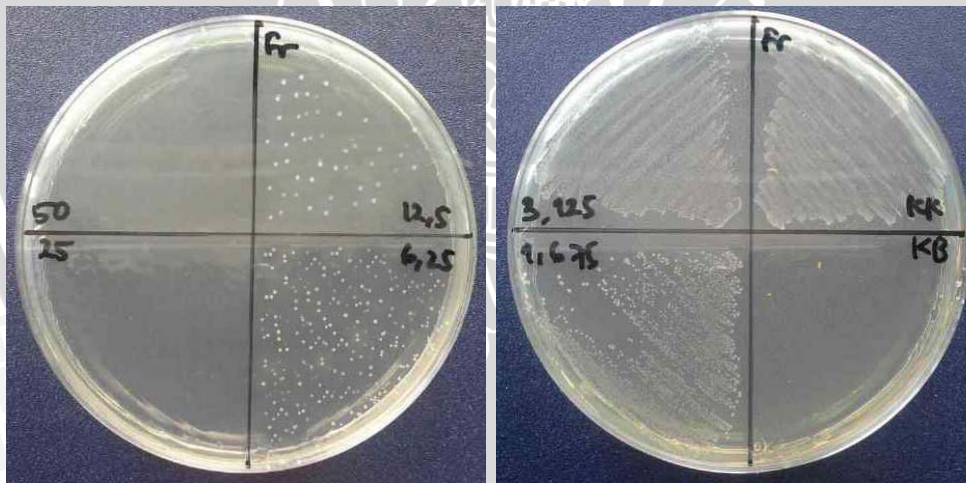
Berdasarkan hasil uji identifikasi bakteri yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar *Streptococcus pyogenes*.

## **5.2 Hasil Ekstrak Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech)**

Rimpang temu kunci yang digunakan dalam penelitian ini merupakan rimpang temu kunci yang diperoleh dari Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur UPT Materia Medika Batu. Rimpang temu kunci tersebut kemudian diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% hingga didapatkan hasil berupa ekstrak kental berwarna coklat keruh sebanyak 15 ml. Kemudian dilakukan uji sterilisasi ekstrak rimpang temu kunci dengan melakukan *streaking* pada media NA dan di inkubasi selama 24 jam, hasilnya didapatkan ekstrak rimpang temu kunci steril.

### 5.3 Hasil Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk memperoleh rentang konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* seminimal mungkin. Penelitian eksploratif yang pertama dilakukan adalah menggunakan metode pengenceran seri dengan rentang konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,675%. Hasil dari penelitian eksploratif pertama tersebut didapatkan pada konsentrasi 50% dan 25% tidak didapatkan adanya pertumbuhan koloni bakteri, sedangkan pada konsentrasi 12,5% sampai 1,675% masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*, seperti pada gambar 5.4.



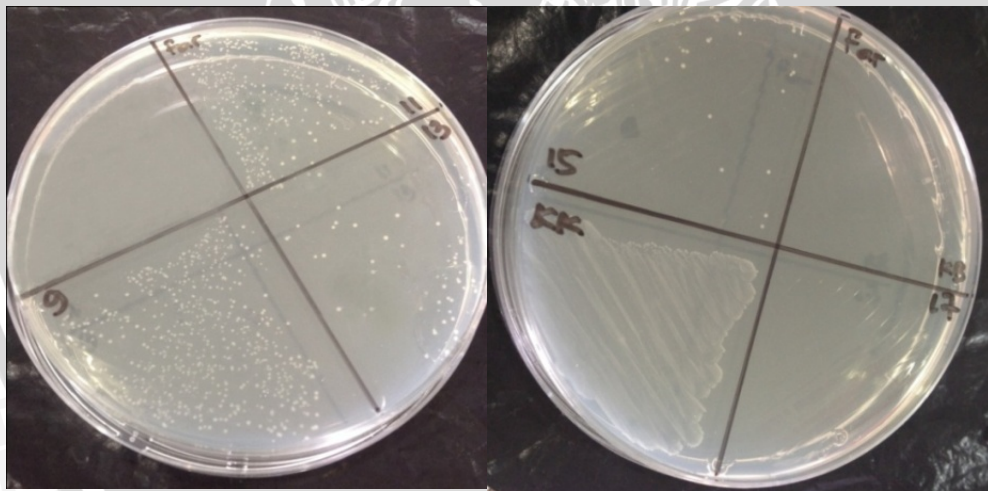
Gambar 5.4 Uji Eksplorasi 1

Keterangan gambar :

- 50% = tidak tampak pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 25% = tidak tampak pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 12,5% = tampak sedikit pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 6,25% = tampak sedikit pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 3,125% = tampak pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 1,675% = tampak pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*

- KK = tampak pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*
- KB = hasil streaking ekstrak rimpang temu kunci steril (tidak tampak pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*)

Berdasarkan hasil dari penelitian eksploratif pertama, dilakukan penelitian eksploratif kedua dengan konsentrasi 7%, 9%, 11%, 13%, dan 15%. Hasilnya pada semua konsentrasi masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*. Kemudian dilakukan uji eksploratif ketiga dengan perapatan konsentrasi yang tepat yaitu konsentrasi 9%, 11%, 13%, 15%, 17%. Hasilnya adalah pada konsentrasi 17% sudah tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*, seperti pada gambar 5.5.



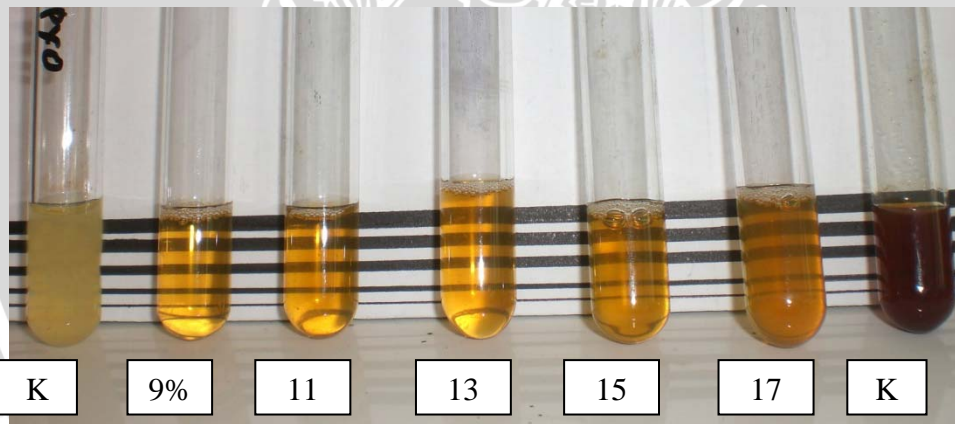
Gambar 5.5 Uji Eksplorasi 3

Keterangan gambar :

- 9% = tampak sedikit pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 11% = tampak sedikit pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 13% = tampak sedikit pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 15% = tampak sedikit pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- 17% = tidak tampak pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*
- KK = tampak pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*
- KB = hasil streaking ekstrak rimpang temu kunci steril (tidak tampak pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*)

#### 5.4 Hasil Uji Efektifitas Antibakteri dengan Penentuan Nilai KHM

Ekstrak rimpang temu kunci yang berwarna kecoklatan setelah dilakukan metode pengenceran seri berubah menjadi berwarna kekuningan. Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar (konsentrasi) terendah bahan antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung) setelah diinkubasi selama 18-24 jam (Dzen *dkk.*, 2003). Setelah diinkubasi kemudian dilakukan pengamatan tingkat kejernihan berdasarkan garis hitam dengan ketebalan yang berbeda sebagai latar belakang tabung.



Gambar 5.6 Hasil Pengamatan Uji Dilusi Tabung

Keterangan: hasil uji dilusi tabung menunjukkan kekeruhan seiring meningkatnya konsentrasi perlakuan

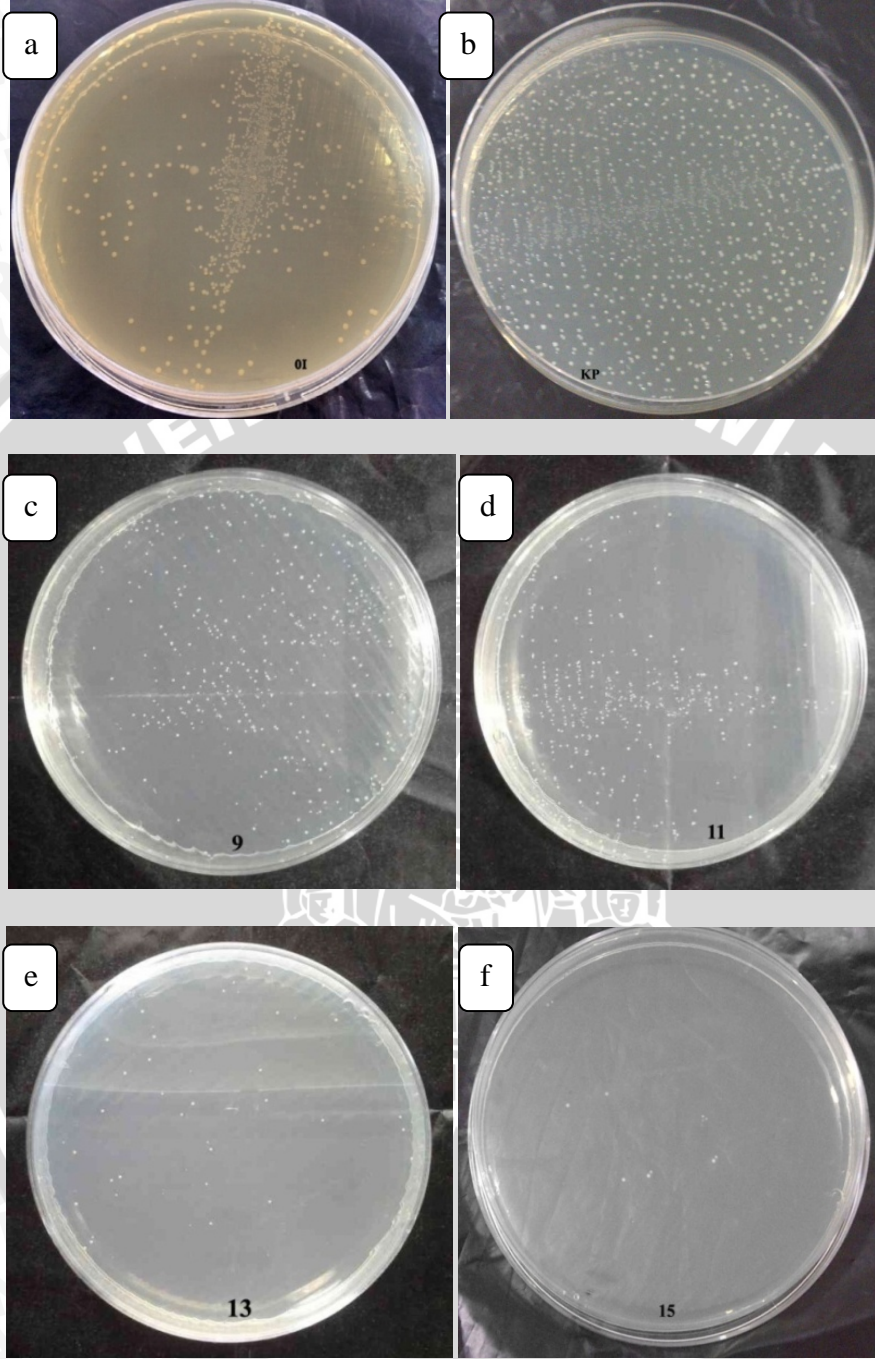
Berdasarkan hasil pengamatan secara visual dan pengukuran tingkat kejernihan pada gambar 5.6 didapatkan hasil pada konsentrasi 9% tabung terlihat jernih tetapi bila diperhatikan, semakin tinggi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci, semakin keruh hasil dilusi tabung yang didapatkan. Hal

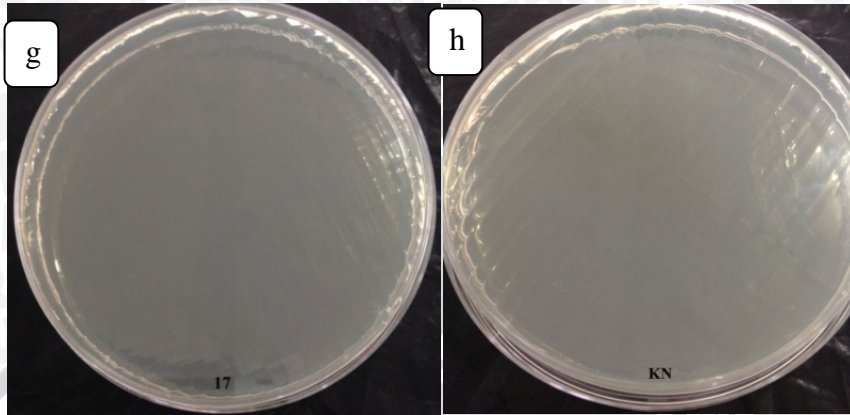


ini dikarenakan hasil yang diperoleh dari ekstraksi rimpang temu kunci berwarna coklat keruh, sehingga semakin banyak jumlah ekstrak yang ditambahkan pada konsentrasi perlakuan, kekeruhan semakin tampak. Berdasarkan pengamatan dapat disimpulkan nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* tidak dapat diamati.

### 5.5 Hasil Uji Efektifitas Antibakteri dengan Penentuan Nilai KBM

Setelah dilakukan pengamatan secara visual untuk menentukan nilai KHM (Kadar Hambat Minimal) selanjutnya masing-masing tabung yang telah berisi bakteri *Streptococcus pyogenes* dan konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci tersebut di *streaking* penuh pada *Nutrient Agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi dilakukan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh pada masing-masing plate dengan menggunakan *colony counter*. Hal ini berlaku untuk ke empat isolat bakteri *Streptococcus pyogenes*. Hasil *streaking* pada NA dapat dilihat pada gambar 5.7.





**Gambar 5.7 Pertumbuhan Koloni *Streptococcus pyogenes* pada NA**

Keterangan gambar :

- (a) *Original Inoculum* (OI) bakteri *Streptococcus pyogenes*
- (b) Kontrol positif bakteri *Streptococcus pyogenes*
- (c) Pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi ekstrak 9%
- (d) Pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi ekstrak 11%
- (e) Pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi ekstrak 13%
- (f) Pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi ekstrak 15%
- (g) Pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada konsentrasi ekstrak 17%
- (h) Kontrol negatif ekstrak rimpang temu kunci

KBM (Kadar Bunuh Minimal) adalah kadar terendah dari antibakteri yang dapat membunuh bakteri ditandai dengan tidak tumbuhnya bakteri pada NA atau pertumbuhan koloni bakterinya kurang dari 0,1% jumlah koloni bakteri pada OI (*Original Inoculum*) (Dzen dkk., 2003). Hasil perhitungan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada *colony counter* dapat dilihat pada tabel 5.1.

Konsentrasi	Jumlah Koloni pada Pengulangan				Rata-rata
	10 <sup>6</sup> CFU/plate				
	1	2	3	4	

0%	2412	2631	1983	2397	2355,75
9%	386	425	381	400	398
11%	373	383	380	368	376
13%	40	36	35	34	36,25
15%	24	14	10	36	21
17%	0	0	0	0	0
OI	1011	1011	1011	1011	1011

**Tabel 5.1** Perhitungan Koloni *Streptococcus pyogenes* yang Tumbuh pada *Nutrient Agar*

Berdasarkan hasil penggoresan dan perhitungan koloni bakteri pada *colony counter* terlihat rerata bakteri pada OI (*Original Inoculum*) sebanyak 1011, yang artinya 0,1% dari 1011 adalah 1,0 sehingga dapat disimpulkan nilai KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari ekstrak rimpang temu kunci berada pada konsentrasi 17%.

Dari data yang tertera dalam tabel 5.1 dapat diketahui bahwa pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* cenderung semakin menurun ketika diberi konsentrasi yang lebih tinggi. Dengan demikian dapat dikatakan pemberian perlakuan ekstrak rimpang temu kunci mempunyai pengaruh sebagai antibakteri yang berbeda tergantung dari besarnya konsentrasi yang diberikan.

## 5.6 Analisis Data

Hasil penelitian ini kemudian dianalisis dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 12.0 for Windows. Analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One-Way* Anova, uji Korelasi *Pearson*, dan uji Regresi.

Sebagai prasyarat analisis statistik parametrik dibutuhkan beberapa pengujian pendahuluan. Syarat penggunaan uji parametric *One-Way* Anova adalah data terdiri dari 2 kelompok atau lebih, data memiliki distribusi yang normal dan homogen (Dahlan, 2006).

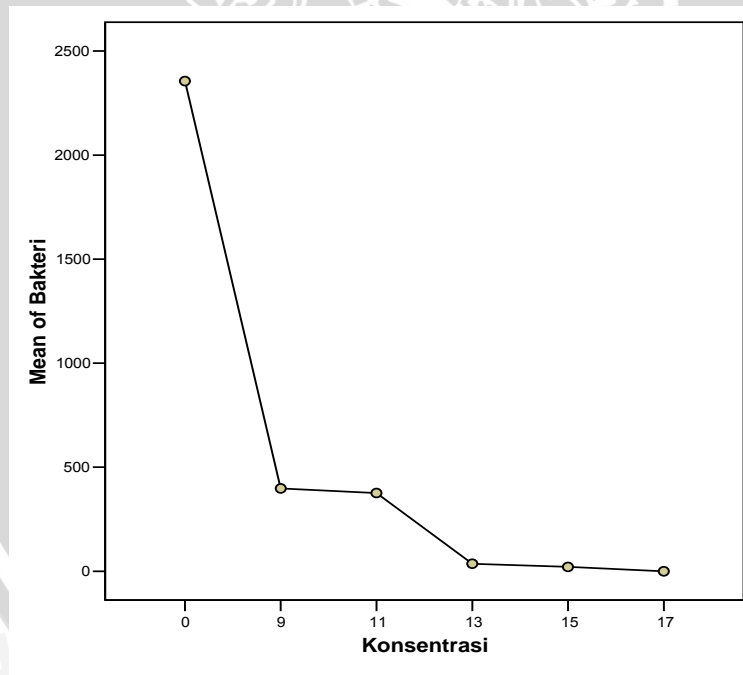
Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov Test* dimana suatu data dikatakan normal jika  $p > 0,05$  (Sarwono, 2010). Berdasarkan uji normalitas, didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,178 ( $p > 0,05$ ) yang berarti bahwa data memiliki distribusi yang normal (Lampiran 3).

Setelah uji normalitas kemudian dilakukan uji homogenitas data untuk mengetahui varian data atau homogenitas data. Suatu data dikatakan homogen bila varian data atau homogenitas harus sama dengan nilai signifikansi  $> 0,05$  (Dahlan, 2004). Berdasarkan pengujian homogenitas data, diketahui bahwa data homogen karena nilai signifikansinya sebesar 0,063 dan data terdiri dari 3 kelompok (kelompok 1, 2 dan 3) yang telah dikelompokkan berdasarkan nilai rata-rata yang hampir sama (Lampiran 3).

Dari data uji normalitas dan uji homogenitas dapat disimpulkan telah memenuhi syarat untuk dilakukan uji *One-Way* Anova.

### 5.6.1 Uji *One-Way* Anova

Analisa selanjutnya dilakukan dengan menggunakan metode uji *One Way* Anova. Uji *One Way* Anova digunakan untuk mengetahui perbedaan nyata antar konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci terhadap rerata pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Dari hasil uji *One Way* Anova didapatkan angka signifikansi sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ) (Lampiran 3). Hal ini berarti perubahan tingkat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci memberikan perbedaan yang signifikan terhadap rerata jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* pada taraf kepercayaan 95%. Jumlah rerata pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes* dapat dilihat pada gambar 5.8.



Gambar 5.8 Rerata Jumlah Pertumbuhan Koloni Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Kemudian dilakukan pengolahan data menggunakan metode *Post Hoc* test.

Uji ini berfungsi untuk membandingkan 2 sampel (kelompok perlakuan atau

konsentrasi dan jumlah koloni) yang memberikan perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) dan yang tidak memberikan perbedaan signifikan.

	0% (KP)	9%	11%	13%	15%	17%
0% (KP)	-	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
9%	0,000*	-	1,000	0,003*	0,002*	0,001*
11%	0,000*	1,000	-	0,005*	0,003*	0,002*
13%	0,000*	0,003*	0,005*	-	1,000	0,997
15%	0,000*	0,002*	0,003*	1,000	-	1,000
17%	0,000*	0,001*	0,002*	0,997	1,000	-

Tabel 5.2 Ringkasan Nilai Signifikansi *Post Hoc Test*

Keterangan:

Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan signifikan

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc* (Lampiran 3) diketahui terdapat 22 kelompok sampel yang menunjukkan perbedaan yang signifikan yaitu pada konsentrasi 0% (KP) terhadap seluruh konsentrasi yang ada, konsentrasi 9% dan 11% terhadap konsentrasi 0%, 13%, 15%, dan 17% dan sebaliknya pada konsentrasi 13%, 15%, 17% terhadap konsentrasi 0%, 9%, dan 11%.

### 5.6.2 Uji Korelasi-Regesi

Uji korelasi *pearson* digunakan untuk mengukur kekuatan hubungan dua variabel atau lebih yang berskala interval (parametrik). Pada penelitian ini, uji korelasi *pearson* digunakan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci dengan pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*. Hasil dari uji korelasi menunjukkan angka signifikansi sebesar 0.000 ( $p < 0,05$ ) (Lampiran 3) yang berarti

terdapat hubungan bermakna antara pemberian ekstrak rimpang temu kunci dengan pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Nilai koefisien korelasi yang didapatkan adalah sebesar -0,943, nilai tersebut berarti terdapat hubungan yang sangat erat antar 2 variabel. Notasi negatif menunjukkan arah hubungan berkebalikan antar 2 variabel yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin sedikit jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

Dalam penelitian ini uji regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci dalam menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*. Dari uji regresi didapatkan nilai Koefisien Determinasi *Adjusted R Square* ( $R^2$ ) sebesar 0,889 (Lampiran 3) yang artinya persentase pengaruh pemberian ekstrak rimpang temu kunci terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* adalah sebesar 88,9% sedangkan 11,9% dipengaruhi variabel pengganggu yang tidak diteliti. Variabel pengganggu tersebut bisa disebabkan oleh lamanya waktu penyimpanan ekstrak, resistensi bakteri uji, suhu tempat penyimpanan ekstrak, suhu inkubasi bakteri, dan kualitas dalam penyimpanan alat-alat laboratorium.

Hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci dengan pertumbuhan koloni bakteri *S. pyogenes* dapat dinyatakan dengan rumus  $Y = 2090,063 - 143,898X$  (Lampiran 3). Y adalah jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* sedangkan X adalah jumlah konsentrasi



ekstrak rimpang temu kunci. Hal ini berarti setiap pengurangan 1% ekstrak rimpang temu kunci yang diberikan pada koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* maka jumlah koloni bakteri akan meningkat sebanyak konstan  $2090,063 \times 10^6$  (karena pada input data kepangkatan jumlah koloni bakteri tidak dimasukkan, sehingga harus dikalikan). Sebaliknya setiap penambahan 1% ekstrak rimpang temu kunci yang diberikan pada koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* maka jumlah koloni bakteri akan menurun sebanyak hingga  $143,898 \times 10^6$  koloni bakteri.



## BAB 6

## PEMBAHASAN

Infeksi saluran akar merupakan peradangan pada pulpa dan saluran akar gigi yang disebabkan oleh polimikroba (Ingle *et al.*, 2002; Walton & Torabinejad, 2008). Mikroorganisme penyebab infeksi ini didominasi oleh adanya bakteri anaerob fakultatif, salah satu bakteri yang banyak ditemukan pada kultur bakteri saluran akar adalah *Streptococcus pyogenes* dengan prevalensi sebesar 16,5%. Selain itu ditemukan pula beberapa bakteri lain yaitu, *Streptococcus mutans* (15,6%), *Streptococcus sanguis* (9,5%), dan *Streptococcus pneumonia* (6,3%) (Topazian, 2002; Al-Hamdani *et al.*, 2011). Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan bakteri uji *Streptococcus pyogenes* yang merupakan bakteri utama penyebab infeksi saluran akar.

Penelitian eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui adanya efek antibakteri ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schleich) terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol. Dengan menggunakan metode maserasi dapat diperoleh senyawa-senyawa aktif yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Pemilihan etanol sebagai pelarut didasarkan pada kemampuan etanol untuk menarik senyawa-senyawa yang tidak larut dalam air (flavonoid, tannin, minyak atsiri, saponin), bersifat polar, mudah didapat dan tidak toksik. (Sampurno, 2010).

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolat bakteri yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri gram positif berbentuk bulat berantai dan berwarna ungu. Sedangkan pada media *blood agar* pertumbuhan bakteri ini ditandai dengan adanya zona translusen disekitar *blood agar*, hal ini menunjukkan bahwa *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri yang bersifat  $\beta$  hemolitik (Cunningham, 2000). Pada uji katalase koloni *Streptococcus pyogenes* menunjukkan reaksi negatif (tidak terdapatnya gelembung udara), yang berarti bakteri ini tidak dapat menguraikan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi air ( $H_2O$ ) dan oksigen ( $O_2$ ) (Marlina, 2008).

Pada penelitian ini dilakukan uji identifikasi bakteri dengan pewarnaan gram, katalase, dan cakram *bacitracin*. Hasil dari pewarnaan gram menunjukkan koloni berbentuk bulat, berwarna ungu dan berantai, pada uji katalase menunjukkan tidak terdapatnya gelembung udara, dan pada uji cakram *bacitracin* menunjukkan terdapatnya zona inhibisi di sekitar cakram. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar *Streptococcus pyogenes* yang merupakan bakteri gram positif grup A yang bersifat  $\beta$ -hemolitik.

Metode yang digunakan dalam penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah metode dilusi tabung (Rollins, 2000). Pada metode dilusi tabung, KHM ditentukan dengan melakukan pengamatan visual kejernihan tabung yang dibantu garis hitam dengan ketebalan yang berbeda sebagai

latar belakang (Maulidi, 2011). Penentuan KHM dilakukan dengan pengamatan tingkat kejernihan tabung secara visual di setiap konsentrasi dengan bantuan garis hitam yang berbeda ketebalannya sebagai latar belakang.

Pengamatan kualitatif menunjukkan pada konsentrasi 9% hasil dilusi tabung menunjukkan kejernihan tetapi bila diperhatikan semakin tinggi konsentrasi ekstrak, hasil dilusi tabungnya semakin keruh. Kekeruhan tersebut mungkin dikarenakan oleh kandungan senyawa tannin pada ekstrak rimpang temu kunci yang bersifat mengendapkan gelatin dan menggumpalkan protein yang merupakan komponen dari *nutrient broth* (media biakan cair) (Kusaldi, 2005), sehingga semakin banyak jumlah ekstrak rimpang temu kunci yang ditambahkan pada konsentrasi perlakuan, kekeruhan semakin tampak.

Hasil pengamatan pada penelitian ini berbanding terbalik dengan indikator kejernihan dalam penentuan nilai KHM (semakin besar konsentrasi ekstrak akan terlihat makin jernih karena pertumbuhan bakteri akan semakin menurun seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak) (Dzen dkk, 2003), sehingga KHM ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* tidak dapat diamati. Cara lain dalam penentuan nilai KHM adalah dengan menggunakan metode dilusi agar dan difusi (Kusaldi, 2005) namun penggunaan metode tersebut membutuhkan waktu yang lama dalam pengerjaannya (Jawetz *et al.*, 2001)

sehingga karena terbatasnya waktu dan biaya pada penelitian ini tidak dapat dilakukan metode tersebut.

Kadar Bunuh Minimal (KBM) ditentukan dengan melakukan *streaking* masing-masing konsentrasi pada media *Nutrient Agar* (NA) yang kemudian diinkubasi dan dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada masing-masing konsentrasi. Penentuan nilai KBM didasarkan pada jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada konsentrasi perlakuan  $< 0,1\%$  dari jumlah pada *Original Inoculum* (OI) (Kartono, 2011). Pada penelitian ini, KBM ditentukan dengan melakukan penggoresan pada media *Nutrient Agar* (NA) dan pada *Original Inoculum* (OI) didapatkan bakteri *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh sebanyak 1011 bakteri (CFU/plate). Hasil dari perhitungan koloni bakteri didapatkan pada konsentrasi 17% tidak terdapat pertumbuhan bakteri yang berarti  $< 0,1\%$  dari jumlah bakteri pada *Original Inoculum* (OI). Dapat disimpulkan KBM ekstrak rimpang temu kunci terdapat pada konsentrasi 17%.

Hasil uji statistik *One-Way Anova* menunjukkan bahwa perubahan tingkat konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci memberikan perbedaan yang signifikan terhadap rerata jumlah koloni *Streptococcus pyogenes*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci, maka akan semakin rendah pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) diketahui mengandung zat-zat antibakteri yaitu minyak atsiri, saponin,

flavonoid, dan tannin (Chong *dkk.*, 2012). Pada penelitian ini nilai Kadar Bunuh Minimal (KBM) terletak pada konsenrasi 17%, sedangkan pada penelitian terdahulu yang dilakukan Fitri Yatulaili (2007) ekstrak rimpang temu kunci diketahui memiliki aktifitas antibakteri terhadap bakteri *Klebseilla Sp.* dengan nilai KHM sebesar 7,9% dan KBM 18,3%. Selain itu ekstrak rimpang temu kunci juga diketahui efektif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan KBM 7% dan KHM 6% (Tulle, 2006). Adanya perbedaan nilai KHM dan KBM pada penelitian ini dengan penelitian terdahulu dapat dikarenakan adanya perbedaan jenis bakteri uji dan perbedaan tingkat virulensi bakteri uji yang berbeda-beda.

Minyak atsiri dan tannin merupakan senyawa antibakteri yang berfungsi untuk mengganggu permeabilitas sel dengan cara pengkerutan dinding sel bakteri. Mekanisme ini akan menyebabkan kerusakan struktur protein dari dinding sel dan kerusakan membran sel sehingga metabolisme bakteri menjadi terganggu (Maulidi, 2011; Juliantina, 2007).

Flavonoid yang terkandung dalam rimpang temu kunci berperan sebagai antibakteri dengan cara mendenaturasi dinding sel yang terdiri atas lipid dan asam amino (Gunawan, 2009). Denaturasi tersebut menyebabkan koagulasi protein dan terganggunya fungsi fisiologis bakteri sehingga akan mengakibatkan rusaknya sel bakteri secara permanen (Agustin, 2007). Saponin memiliki kemampuan merusak membran sel bakteri melalui interaksi gugus lipofiliknya dengan membran interna bakteri (retikulum endoplasma

dan badan golgi) (Yunita, 2010). Interaksi ini menimbulkan gangguan pada permeabilitas sel bakteri sehingga bakteri tidak dapat melakukan aktivitas hidup dan berakibat pada kematian bakteri (Bruneton, 2008).

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik, dapat disimpulkan terdapat penurunan jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* seiring dengan peningkatan konsentrasi perlakuan. Hal ini membuktikan bahwa hipotesis dalam penelitian ini adalah benar. Namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan nilai KHM ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap *Streptococcus pyogenes*. Selain itu aplikasi klinis dari penelitian ini juga masih memerlukan penelitian lanjutan secara *in vivo* terhadap hewan coba untuk mengetahui dosis yang aman bagi manusia, efek farmakokinetik, efek farmakodinamik dan efek toksiknya sehingga dapat digunakan secara langsung oleh masyarakat sebagai pengobatan alternatif terhadap infeksi yang disebabkan *Streptococcus pyogenes*.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) mempunyai efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.
2. Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap *Streptococcus pyogenes* tidak dapat diamati, sedangkan Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap *Streptococcus pyogenes* berada pada konsentrasi 17%.
3. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak rimpang temu kunci maka semakin sedikit pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*.

#### 7.2 Saran

Adapun saran yang peneliti berikan dari penelitian ini adalah :

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan metode dilusi agar dan difusi agar nilai KHM ekstrak rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) terhadap *Streptococcus pyogenes* dapat diketahui.



2. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang senyawa-senyawa aktif lainnya yang terdapat pada rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) yang mempunyai efek sebagai antiakteri.
3. Diperlukan penelitian tentang aplikasi klinis ekstrak temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) sebagai alternatif obat sterilisasi saluran akar pada perawatan saluran akar serta penyakit infeksi lainnya yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pyogenes*.
4. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai efek antibakteri ekstrak temu kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlech) secara *in vivo* pada hewan coba untuk melihat farmakodinamik, farmakokinetik, dan toksisitas ekstrak temu kunci pada manusia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, ET. 2007. *Daya Antibakteri Ekstrak Buah Mahkota dewa (Phaleria Macrocarpa (scheff) Boerl) Terhadap Bakteri Streptococcus alpha haemolyticus*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Akiyama, H. Antibacterial Action of Several Tannins Against Staphylococcus aureus. *Jurnal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001, vol. 48.
- Al-Hamdani, Adnan H, Al-Yasiri Rahi K, Manky Mahmood A, Al-Jannat Mahab A. Evaluation of the Antimicrobial Effect of Endodontic Sealers on Microbiota Associated with Root Canal Infections, *QMJ*, 2011, 7 (12):2.
- Ansel, HC. 2008. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. UI-Press. Jakarta, p. 606-9, 617.
- Bagg, J. Mac Farlane, T.W., Poxton, I.R., Smith, A.J. 2006. *Essentials of Microbiology for Dental Students, 2<sup>nd</sup> Ed.*, Oxford University press, Glasgow, p,115-116.
- Bakti, KR. 2010. *Daya Antibakteri Infusum Kulit Buah Delima (Punica granatum L.) Terhadap Streptococcus viridans Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Bender, IB. The Incidence of Bacteremia in Endodontics Manipulation: Preliminary Report. *Am Asc Endodontics*, 2003; 29 (11): 697-700.
- Brooks, et al. 2007. *Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology, 24<sup>th</sup> Ed.*, Mc Graw Hill Comp, New York, p. 239-241.
- Bruneton J. 2008. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants 2<sup>th</sup> Ed*, Lavoisier Publishing, Paris.
- Charuniza, DPS. 2012. *Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam (Syzygium polyanthum [Wight.] Walp.) Terhadap Staphylococcus Aureus ATCC 6538 dan Escherichia coli ATCC 11229 Secara In Vitro*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Chong, ET et al. *Boesenbergia rotunda*: from Ethnomedicine to Drug Discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, p. 10.
- Cunningham, MW. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infection, *Clinical Microbial*, 2000; 12: 170-511.

- Dahlan, S. 2006. *Statistika Untuk Kedokteran dan Kesehatan*, Arkans. Jakarta, p. 11-16.
- Dzen SM, Roekistiningsih, Sanarto S, Winarsih S. 2003. *Bakteriologi Medik*. Tim Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Febianti Zahrah. 2010. *Uji Efek Antimikroba Ekstrak Daun Kenikir (Cosmos caudatus H.B.K) Terhadap Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) dan Escherechia coli In Vitro*. Tugas akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Ferreti, J. 2001. *Complete Genom Sequence of an M1 Strain of Streptococcus pyogenes*, Proc. Natl. Scad. Sci, USA.
- Forbes, A Berty. 2007. *Bailey and scott's Diagnostic Microbiology*, 12<sup>th</sup> Ed., Mosby, St.Louis, p. 270.
- Gamse, T. 2002. *Liquid-Liquid Extraction and Solid-Liquid Extraction*. Institute of Thermal Process and Environmental Engineering Graz University of Technology. Austria, p. 2-24.
- Gunawan, D. 2007. *Ramuan Tradisional Untuk Keharmonisan Suami Istri*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Harlianti, Sri Mariska, Kuswandi, Irvati Susi. Daya Antibakteri Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) Terhadap *Salmonella typhi* dan *Streptococcus haemolytic*  $\alpha$  non pneumonia. *Pharmacon*, 2011; 12 (2): 65.
- Harmanto, Ning. 2007. *Herbal Untuk Keluarga Jus Herbal Segar dan Menyehatkan*, PT. Elexmedia Komputindo, Jakarta, p. 8.
- Hermawan, Udhi Eko, Setyawan, Ahmat Dwi. 2003. *Review: Ellagitannin Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi*. Biofarmasi Jurusan Biologi FMIPA UNS, Surakarta 1 (1):25-38.
- Ingle, JI, Backland LK. 2002. *Endodontics*, 5<sup>h</sup> Ed., BC Decker Inc, London, p. 67-69.
- Jalali, Gosla. 2011. *Antimicrobial Agents Against Orofacial Infections*. Tesis. Tidak diterbitkan, Faculty of Dentistry University of Oslo, Norway.
- Jawetz, Melnick & Adelberg. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.
- Juliantina, Farida M, Dewa Ayu Citra, Nirwani, Bunga, Nurmasitoh, Titis, Bowo, Endrawati Tri. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Ant Bakterial tetradap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 2007.
- Kartono, Rudy. 2011. *Efek Ekstrak Rimpang Temu Kunci (Boesenbergia pandurata) Sebagai Antibakteri Terhadap Staphylococcus aureus*

- Secara In Vitro*. Tugas akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Katzung, BG. 2001. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Salemba Medika, Jakarta, p. 3-16.
- Krisnawati, Inti. 2008. *Healing Food for Kids*. PT gramedia pustaka utama, Jakarta, p. 10.
- Krompti. A Microbiological Study of Periapical Lesions in Single Rooted Teeth with Open and Closed Root Canal. *Acta Stomat Croat*, 2002; 36 (4): 375-379.
- Kusaldi, Alda. Uji Efektifitas Dekok Daun Jambu Biji (*Psidium guajava*) sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). *Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang*, 2005: 8.
- Kusmayati, Agustini, N.W.R. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (*Porphyridium cruentum*), *Biodiversitas*, 2011: 48-53.
- Manan, MHA. 2008. *Kamus Kimia*. Bumi Aksara, Jakarta.
- Marlina. Identifikasi Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan Metode Biolog dan Deteksi Gen ToxR nya Secara PCR. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 2008; 13(1): 3.
- Maulidi, Shalahudin. 2011. *Uji Efektivitas Dekok Daun Kemangi (ocimum basilicum forma citratum back) sebagai Antimikroba Streptococcus viridans secara In Vitro*. Tugas akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Murray, et al., 2002. *Medical Microbiology* 7<sup>th</sup> Ed., Mosby Inc, Missouri.
- Notobroto, BH. 2005. *Penelitian Eksperimental Dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Perhitungan Besar Sampel Angkatan III*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.
- Nurhayati, DM. 2010. *Konsentrasi Efektif Ekstrak Daun Salam dalam Menghambat Pertumbuhan Streptococcus Mutans pada Polyvynyl Siloxane*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Pambayun, Rindit, Gardjito Murdijati, Sudarmaji Slamet, Kuswanto, Kapti Rahayu. Kandungan fenol dan sifat antibakteri dari berbagai jenis ekstrak produk gambir (*Uncaria gambir Roxb*). *Majalah farmasi indonesia*, 2007, 18(3). 141-146.
- Qualthrough, AJE, Satterthwaite JD, Morrow LA, Brunton PA. 2005. *Principles of Operative Dentistry*. Blackwell Pub, Oxford, p. 51.

- Queiroz, Alexandra Mussolino de, Filho Paul Nelsom. Antibacterial Activity of Root Canal Filling Materials for Primary Teeth: Zinc Oxide and Eugenol Cement, Calen Paste Thickened with Zinc Oxide, Sealapex and Endo REZ. *Braz Dent*, 2009; 20 (4): 290-296.
- Rahardjo, A. 2006. *Penyakit Kehilangan Gigi Menonjol di Indonesia*. Sinar Harapan. Jakarta, p. 2.
- Rani, Anuradha, Ashok Copra. Isolation and Identification of Root Canal Bacteria from Symptomatic Non Vital Teeth with Periapical Pathosis, *Endodontology*, 2000: 7-12.
- Rollins, DM., 2000. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Tube Dilution Methods. Pathogenic University of Maryland. <http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/LabMaterialsMethods/BrothTubeMIC.tm>. Diakses 9 Desember 2013.
- Rukmana, Rahmat. 2004. *Temu-Temuan Apotik Hidup di Pekarangan*. Penerbit Kanisius (Anggota IKAPI), Yogyakarta.
- Samaranayake, LP. 2002. *Essential Microbiology for Dentistry* 2<sup>nd</sup> Ed., Churchill livingstone elsevier, Edinburgh.
- Samaranayake, LP. 2006. *Essential Microbiology for Dentistry* 3<sup>rd</sup> Ed., Churchill livingstone elsevier, Edinburgh.
- Sampurno. 2000. *Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan, Jakarta, p. 35.
- Sanjaya, H. 2007. *Khasiat Antibakteri Bahan Irigasi Infusum Daun Sirih 20% Sodium Hipoklorit 2,5% dan Hidrogen Peroksida Terhadap Streptococcus viridans*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Sarwono, Jonathan. 2010. *Teori Analisis*. EGC, Jakarta.
- Schwan, William. 2007. Gram Positive of Strrtococcus pyogenes. University of Wisconsin-La Crosse. [http://bioweb.uwlex.edu/bio203/s2007/falk\\_pete/identification.htm](http://bioweb.uwlex.edu/bio203/s2007/falk_pete/identification.htm), Diakses 18 Oktober 2013.
- Setyabudi, Rianto. 2009. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5* (cetak ulang dengan perbaikan). Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- Tanu I. 2007. *Farmakologi dan Terapi, Edisi Kelima*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, p. 585-587.
- Todar, Kenneth, 2008. Streptococcus pyogenes and Streptococcal Disease. [http://www.textbookofbacteriology.net/streptococcus\\_2.html](http://www.textbookofbacteriology.net/streptococcus_2.html). Diakses 12 Oktober 2013.
- Topazian, R.G. 2002. *Oral and Maxillofacial Infection* 4<sup>th</sup>. W.B. Sanders, Philadelphia, p. 33-34.

- Tronstad, L. 2013. *Clinical Endodontic*, Norway Pub, Thieme, p.1-2, 104-116.
- Tulle, Andrew William. 2006. *Efek Ekstrak Temu Kunci (Kaempferia pandurata Roxb.) sebagai Antimikroba terhadap Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)*. Tugas akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Utami, WP. 2012. *Efek Ekstrak Etanol 70% Rimpang Temu Kunci (boesenbergia pandurata (Roxb.) Schlechter) Terhadap Kadar Asam Urat Darah Tikus Yang Diinduksi Kalium Oksonat*. Tugas Akhir, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Farmasi Universitas Indonesia, Depok.
- Vichayanrat, S., 2005. Helicobacter pylori and Streptococcus pyogenes in Dental Plaque of Children. [http://iadr.confex.com/iadr/sea05/preliminaryprogram/abstract\\_69638.htm](http://iadr.confex.com/iadr/sea05/preliminaryprogram/abstract_69638.htm). Diakses 12 Oktober 2013.
- Walton, RE. Torabinejad M. 2008. *Prinsip & praktik ilmu endodonsia*, Edisi Ketiga; alih bahasa, Narlan Sumawinata; editor bahasa indonesia, Lilian Juwono. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Wijaya, HD. 2011. *Uji Efektifitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam (Syzygum polyanthum) Terhadap Shigella dysenteriae Isolat Labkesda Surabaya secara In Vitro*. Tidak Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Yatulaili, Fitri. 2007. *Uji Daya Anti Bakteri Minyak atsiri Rimpang Temu Kunci (Boesenbergia pandurata Roxb. schlecht) Terhadap Klebsiella sp. dan Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Yunita, Marina. 2010. *Kadar Hambat Minimal Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (Jatropha curcas) Terhadap Isolat Salmonella typhi dari Berbagai Daerah di Indonesia secara In Vitro dengan Metode Dilusi Agar*. Tugas akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.