

**UJI EFEK ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL  
DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum*) TERHADAP  
*Streptococcus pyogenes* SECARA *IN VITRO***

**TUGAS AKHIR**

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



**Oleh:**

**Kesuma Dewi I. W. D  
NIM : 105070400111006**

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

**2014  
25**

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak.....	v
Abstract.....	vi
Daftar Isi.....	vii
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv

**BAB 1 PENDAHULUAN**

1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Keilmuan.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4

**BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA**

2.1 Salam ( <i>Syzygium polyanthum</i> ).....	5
---	---



2.1.1	Klasifikasi Salam .....	5
2.1.2	Ekologi dan Budidaya Salam .....	5
2.1.3	Morfologi Salam .....	6
2.1.4	Kandungan Kimia Daun Salam .....	7
2.1.5	Aktivitas Farmakologi .....	9
2.2	<i>Streptococcus</i> .....	10
2.2.1	Klasifikasi <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	11
2.2.2	<i>Streptococcus pyogenes</i> .....	11
2.2.3	Penentu Patogenesis dan Toksin .....	12
2.3	Infeksi Endodontik .....	13
2.3.1	Definisi .....	13
2.3.2	Etiologi dan Patogenesis .....	13
2.4	Perawatan Endodontik .....	13
2.4.1	Preparasi Saluran Akar .....	14
2.4.2	Sterilisasi Saluran Akar .....	15
2.4.3	Pengisian Saluran Akar .....	16
2.5	Ekstraksi .....	16
2.5.1	Ekstraksi dan Ekstrak .....	16
2.5.2	<i>Menstruum</i> .....	17
2.5.3	Metode Ekstraksi .....	18
2.5.3.1	Cara Dingin .....	18
2.5.3.2	Cara Panas .....	18
2.6	Antibakteri .....	19
2.6.1	Resistensi Bakteri terhadap Antibiotik .....	20
2.6.2	Uji Antibakteri .....	21



**BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....23

3.2 Hipotesis Penelitian .....24

**BAB 4 METODE PENELITIAN**

4.1 Rancangan Penelitian.....25

4.2 Populasi dan Sampel.....25

4.3 Variabel Penelitian .....26

    4.3.1 Variabel Bebas.....26

    4.3.2 Variabel Tergantung .....26

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....26

4.5 Alat dan Bahan Penelitian.....26

    4.5.1 Alat.....26

    4.5.2 Bahan.....26

4.6 Definisi Operasional.....27

4.7 Prosedur Penelitian.....28

    4.7.1 Identifikasi Bakteri.....28

    4.7.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji .....29

    4.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Salam  
         (*Syzygium polyanthum*).....30

    4.7.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam  
         (*Syzygium polyanthum*) terhadap *Streptococcus pyogenes*  
         dengan Metode Dilusi Tabung .....30



4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam ( <i>Syzygium polyanthum</i> ) terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i> dengan Metode Dilusi Agar.....	32
4.7.6 Kerangka Operasional Penelitian Metode Dilusi Tabung .....	33
4.7.7 Kerangka Operasional Penelitian Metode Dilusi Agar .....	34
4.8 Analisis Data .....	34

**BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

5.1 Identifikasi <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	36
5.2 Ekstrak Etanol Daun Salam ( <i>Syzygium polyanthum</i> ) .....	38
5.3 Hasil Uji Dilusi Tabung.....	38
5.4 Hasil Penelitian KHM dengan Metode Dilusi Agar.....	39
5.5 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	44
5.6 Analisis Data .....	49
5.6.1 Uji <i>One-Way</i> ANOVA .....	49
5.6.2 Uji Korelasi-Regresi .....	50

**BAB 6 PEMBAHASAN .....**

**BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN**

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

**DAFTAR PUSTAKA .....**

**LAMPIRAN .....**



## ABSTRAK

Dewanti, Kesuma D.I.W. 2013. **Uji Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *In Vitro***. Tugas Akhir. Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. drh. Sri Murwani, MP. (2) drg. Chandra Sari Kurniawati, Sp.KG.

Infeksi endodontik adalah infeksi polimikroba pada pulpa dan saluran akar gigi yang terutama disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pyogenes*. Daun salam (*Syzygium polyanthum*) memiliki kandungan yang bersifat sebagai zat antibakteri, antara lain, minyak atsiri, flavonoid, dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Desain penelitian yang digunakan adalah *true experiment-post test only control group design* dengan menggunakan metode dilusi agar dan dilusi tabung. Konsentrasi ekstrak daun salam yang digunakan adalah 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%. Data dianalisa secara statistik menggunakan uji *one-way ANOVA*, uji korelasi Pearson dan uji regresi dengan  $\alpha = 0,05$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun salam mempunyai efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan nilai KHM sebesar 2% dan KBM sebesar 2,5%, serta semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun salam maka semakin rendah pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Kesimpulan berdasarkan penelitian ini adalah ekstrak etanol daun salam mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Berdasarkan hasil penelitian ini, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui zat antibakteri utama daun salam, serta penelitian lebih lanjut secara *in vivo* maupun terhadap manusia.

Kata kunci: Ekstrak daun salam, *Streptococcus pyogenes*, Kadar Hambat Minimal (KHM), Kadar Bunuh Minimal (KBM), infeksi endodontik.

## ABSTRACT

Dewanti, Kesuma D.I.W. 2013.. **Test Antibacterial Effects of Bay Leaf (*Syzygium polyanthum*) Ethanol Extract against *Streptococcus pyogenes* In Vitro**. Final Assignment. Dentistry Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. drh. Sri Murwani, MP. (2) drg. Chandra Sari Kurniawati, Sp.KG.

Endodontic infection is a polymicrobial infection of the pulp and root canals, mainly caused by *Streptococcus pyogenes*. Bay leaf (*Syzygium polyanthum*) have antibacterial agents contain essential oils, flavonoids, and tannins. This study aimed to determine the antibacterial effects of bay leaves extracts against *Streptococcus pyogenes* in vitro. The design research is a true experiment - post test only control group design using dilution agar method and dilution tube method. Concentration of bay leaves extract which used was 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, and 3%. The data were statistically analyzed using one-way ANOVA test, Pearson correlation test and regression test with  $\alpha = 0,05$ . The results showed that the ethanol extract of bay leaves have antibacterial effect on the growth of *Streptococcus pyogenes* with MIC value is 2% and MBC value is 2,5%, as well as the higher concentration of ethanol extract of bay leaves, the lower the growth of the bacteria *Streptococcus pyogenes*. The conclusion of this study is ethanol extract of bay leaves have antibacterial effects against *Streptococcus pyogenes* in vitro. Based on these results, it is necessary to investigate the main antibacterial substance of bay leaves, as well as further studies in vivo and in humans.

Keywords: Bay leaf extract, *Streptococcus pyogenes*, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), endodontic infection.

## BAB 1

## PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Infeksi endodontik adalah infeksi pada pulpa dan saluran akar gigi yang disebabkan oleh polimikroba (Walton & Torabinejad, 2008). Infeksi bakteri terhadap pulpa dan saluran akar gigi dapat melalui berbagai macam cara, seperti karies yang terbuka atau penyebab lain, misalnya, prosedur restorasi yang salah, atrisi, erosi, dan abrasi, serta dapat pula melalui poket periodontal yang masuk melalui foramen apikalis (Qualtrough *et al.*, 2005; Walton & Torabinejad, 2008). Mikroorganisme yang banyak ditemukan (sekitar 80%) pada kultur bakteri saluran akar adalah *Streptococcus* dan *Staphylococcus* (Topazian, 2002). Selain itu, ditemukan pula *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, dan *Lactobacillus* (Ingle & Bakland, 2002).

Bakteri *Streptococcus* yang paling banyak ditemukan pada infeksi endodontik adalah *Streptococcus pyogenes* (16,5%), yang merupakan salah satu penyebab tersering pada inflamasi lanjutan setelah pulpitis (Al-Hamadani *et al.*, 2011; Brook, 2002). *Streptococcus pyogenes* dapat ditemukan pada tubuh manusia, terutama pada kulit dan membran mukosa, dan merupakan bakteri patogen. Bakteri ini menyusun sekitar 25% flora normal pada rongga rongga mulut dan berpotensi menyebabkan infeksi streptokokal dengan prevalensi kejadian penyakit sekitar 5-15%. *Streptococcus pyogenes* dapat menyebabkan beberapa infeksi lain, antara lain, *tonsillitis*, *pharyngitis*, *sinusitis*, *cellulitis*, *otitis media*, *scarlet fever*, endokarditis akut, serta infeksi supuratif lainnya (Todar, 2008).

Salam atau *Syzygium polyanthum*, yang dikenal sejak dahulu sebagai bumbu dapur, telah direkomendasikan oleh Badan Pengawas Obat-obatan dan Makanan MUI sebagai salah satu dari Sembilan tanaman obat unggulan (Muafidah, 2008). Bagian yang paling banyak digunakan adalah daunnya yang memiliki rasa kelat dan bersifat sebagai *astringent*. Selain itu, kulit batang, akar, dan buahnya juga berkhasiat sebagai obat (Dalimartha, 2006). Kandungan kimia daun salam adalah minyak atsiri 0,17%, tanin, dan *flavonoid* (Kurniawati, 2010). Minyak atsiri secara umum berfungsi sebagai antimikroba dan dapat meningkatkan kemampuan fagosit (Sudarsono, 2002). *Flavonoid* bermanfaat sebagai antiinflamasi, antivirus, antioksidan, antibakteri, menguatkan sistem kekebalan tubuh, dan merangsang pembentukan sel T (Krisnawati, 2008). *Flavonoid* juga diketahui telah disintesis oleh tumbuhan dalam responnya terhadap infeksi mikroba sehingga efektif terhadap sejumlah mikroorganisme secara *in vitro* (Sudarsono, 2002). Tanin juga dapat bersifat antimikroba karena dapat mengerutkan membran sel bakteri sehingga mengganggu permeabilitas sel (Ajizah, 2004). Untuk mengekstrak senyawa minyak atsiri, *flavonoid*, dan tanin dapat dilakukan dengan metode ekstrak etanol (Reveny, 2011).

Penelitian yang dilakukan Charuniza (2012) membuktikan bahwa ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) mempunyai efek antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, masing-masing menunjukkan konsentrasi hambat minimal (KHM) 10% dan 20%. Selain itu, Wijaya (2011) juga membuktikan bahwa ekstrak etanol daun salam mempunyai efek antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi bunuh minimal (KBM) 30%.

Hingga saat ini belum ada penelitian mengenai efek antibakteri ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap *Streptococcus pyogenes*. Mengingat daun salam mengandung berbagai senyawa antibakteri, antara lain minyak atsiri, *flavonoid*,

dan tanin, maka penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) memiliki efek antibakteri terhadap *S. pyogenes* secara *in vitro*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Mengetahui Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.
- b. Mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.
- c. Menganalisis hubungan ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap tingkat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Keilmuan

Menambah ilmu pengetahuan terutama dalam bidang kedokteran gigi yang berkaitan dengan pemanfaatan daun salam (*Syzygium polyanthum*) sebagai antibakteri.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar penelitian selanjutnya dalam pengembangan obat antibakteri yang mudah didapat, aman, dan efektif dari bahan daun salam (*Syzygium polyanthum*).

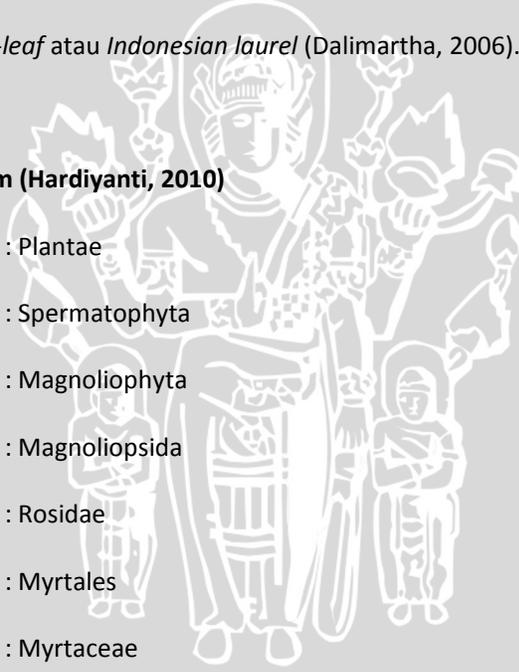


## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

**2.1 Salam (*Syzygium polyanthum*)**

Tumbuhan salam dalam bahasa ilmiah disebut *Syzygium polyanthum*, sedangkan nama sinonimnya adalah *Eugenia polyantha* Wight. dan *E.lucidula* Miq. Salam mempunyai nama yang berbeda pada tiap daerah, antara lain seperti *meselangan*, *ubar serai* (Sumatera), *salam*, *gowok*, dan *manting* (Jawa). Dalam bahasa Inggris disebut sebagai *Indonesian bay-leaf* atau *Indonesian laurel* (Dalimartha, 2006).

**2.1.1 Klasifikasi Salam (Hardiyanti, 2010)**

Kingdom	: Plantae
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae
Genus	: Syzygium

Spesies : *Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp.

**2.1.2 Ekologi dan Budidaya Salam**

Tumbuhan salam (*Syzygium polyanthum*) telah dikenal oleh masyarakat Indonesia. Tumbuhan ini tumbuh di wilayah iklim tropis dan subtropis, termasuk Asia

Tenggara dan Cina (Studiawan & Santosa, 2005). Tumbuhan salam dapat tumbuh di berbagai daerah, baik di dataran rendah maupun pegunungan dengan ketinggian 1800 m dpl pada suhu 22-30°C. Tumbuhan salam membutuhkan intensitas matahari penuh dengan drainase yang baik, serta iklim yang panas dengan curah hujan yang cukup merata. Tumbuhan ini tidak tahan terhadap kekeringan sehingga tidak sesuai bila ditanam pada lokasi dengan musim kemarau yang panjang (Muafidah, 2008).

Tumbuhan salam memerlukan curah hujan 1500-4500 mm/tahun disertai bulan kering (curah hujan < 60 mm/bulan) berturut-turut 2-3 bulan atau tidak boleh lebih dari 3 bulan. Tumbuhan salam mudah mengalami kekeringan, terutama tumbuhan salam muda. Pada tumbuhan salam dewasa, kekurangan air dapat merontokkan bunga yang hampir matang petik (Muafidah, 2008).

### 2.1.3 Morfologi Salam

Tumbuhan salam dapat mencapai ketinggian 25 m, batang berbentuk bulat, permukaan licin, berakar tunggang, dan bertajuk rimbun. Daun salam adalah daun tunggal, letak berhadapan, panjang tangkai daun mencapai 0,5-1 cm. Helai daunnya berbentuk lonjong sampai elips, ujung meruncing, pangkalnya runcing, tepi rata, bertulang menyirip, permukaan atas daun licin berwarna hijau tua, permukaan bawahnya berwarna hijau muda, panjang 5-15 cm, dan lebar 3-8 cm, serta jika diremas berbau harum (Gambar 2.1). Bunga salam majemuk yang keluar dari ujung ranting, warnanya putih, dan berbau harum. Buah salam adalah buah buni, berbentuk bulat dengan diameter 8-9 mm, buah muda berwarna hijau, setelah masak berwarna merah gelap, dan rasanya agak sepat (Gambar 2.1). Biji salam berbentuk bulat dengan diameter  $\pm 1$  mm dan berwarna cokelat (Dalimartha, 2006).



**Gambar 2.1 Daun dan Buah Salam (*Syzygium polyanthum*)**  
(Sumono & Wulan, 2009; Muafidah, 2008)

#### 2.1.4 Kandungan Kimia Daun Salam

Kandungan kimia yang terdapat dalam *Syzygium polyanthum* adalah minyak atsiri, *flavonoid*, dan tanin (Wijaya, 2011).

##### a. Tanin

Tanin terdapat pada berbagai tanaman, baik yang digunakan sebagai bahan makanan oleh manusia maupun hewan. Perbedaan kadar tanin pada tanaman dipengaruhi oleh tingkat kematangan, umur daun, dan musim. Secara umum, tanin mencapai kandungan tertinggi ketika masih muda dan menurun setelah tua (Mukhlisoh, 2010). Tanin dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut. Pelarut yang umum digunakan adalah metanol, etanol, maupun aseton (Deny, 2007).

Aktivitas antibakteri tanin yaitu berefek spasmolitik yang dapat menyebabkan pengkerutan dinding sel bakteri sehingga dapat mengganggu permeabilitas sel sehingga aktivitas hidup sel terganggu, menghambat pertumbuhan, bahkan pada dosis tertentu dapat mengakibatkan kematian pada bakteri. Selain itu, tanin juga dapat membentuk ikatan kompleks dengan protein sehingga dapat menginaktivasi *adhesin* bakteri, enzim, koagulator bakteri sehingga mengakibatkan aktivitas fisiologis sel bakteri terganggu. (Parwata & Dewi, 2008).

### b. Flavonoid

*Flavonoid* terdapat pada seluruh bagian tumbuhan, yaitu akar, kayu, daun, kulit, tepung sari, nektar, biji, dan buah. *Flavonoid* berupa senyawa fenol dan merupakan senyawa polar sehingga dapat larut dalam pelarut metanol (MeOH), etanol (EtOH), *butanol* (BuOH), aseton, *dimethylformamide* (DMF), *dimethylsulfoxide* (DMSO), air, dan lain-lain (Mukhlisoh, 2010).

*Flavonoid* bersifat sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengganggu struktur protein, dan protein tidak dapat berfungsi lagi sehingga terjadi denaturasi protein dan asam nukleat. Denaturasi tersebut mengakibatkan koagulasi protein serta integritas membran dan fungsi fisiologis bakteri terganggu. Metabolisme yang terganggu akan menyebabkan rusaknya sel secara permanen karena kebutuhan energinya tidak tercukupi (Agustin, 2007; Akiyama *et al.*, 2001).

### c. Minyak Atsiri

Minyak atsiri disebut juga minyak eteris atau minyak terbang (*volatile oil*) yaitu minyak yang mudah menguap dan diperoleh dari tumbuhan tertentu dengan cara penyulingan. Biasanya tidak berwarna terutama bila keadaannya masih segar, tetapi setelah mengalami proses oksidasi dan pendamaran makin lama warnanya berubah menjadi gelap (Nurhayati, 2010; Wijaya, 2011).

Minyak atsiri bersifat antibakteri dengan cara menghambat proses terbentuknya dinding atau membran sel sehingga tidak terbentuk sempurna. Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri adalah yang mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Senyawa fenol dan turunannya bila berinteraksi dengan dinding atau membran sel mikroorganisme dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas mikroorganisme dan

denaturasi protein. Interaksi dengan mikroorganisme menyebabkan perubahan molekul protein sehingga struktur protein berubah dan mengakibatkan terjadinya koagulasi. Protein yang mengalami denaturasi dan koagulasi dapat menyebabkan hilangnya aktivitas fisiologis sehingga tidak bisa berfungsi dengan baik. Perubahan struktur protein pada dinding atau membran sel bakteri dapat meningkatkan permeabilitas sel sehingga menghambat pertumbuhan sel dan kemudian sel menjadi rusak (Sanjaya, 2007).

#### 2.1.5 Aktivitas Farmakologi

Peneliti dari Universitas Gadjah Mada, Retno Sudewi (1992), telah meneliti kandungan daun salam. Hasil penelitian tersebut antara lain, dengan kromatografi gas menunjukkan bahwa minyak atsiri daun salam mengandung 28 komponen, eugenol merupakan salah satunya, sedangkan dengan kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa minyak atsiri daun salam terdapat seskuiterpen lakton dan mengandung *fenol*. Konsentrasi terkecil minyak atsiri yang dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* adalah 5%, sedangkan terhadap *Escherichia coli* adalah 40% (Dalimartha, 2006).

Uji mikrobiologi dengan menggunakan metode cakram menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun salam mempunyai efek menghambat pertumbuhan *Salmonella sp.*, *Vibrio cholera*, dan *E.coli*, tetapi *Enterobacter sp.* Bersifat resisten (Dalimartha, 2006).

Penelitian sebelumnya mengenai daun salam, didapatkan hasil bahwa ekstrak air daun salam mempunyai efek hipoglikemik (menurunkan kadar gula dalam darah) pada tikus penderita diabetes melitus yang tidak tergantung pada insulin (DMTTI), sedangkan pada tikus penderita diabetes melitus yang tergantung pada insulin (DMTI) tidak tampak adanya efek hipoglikemik (Dalimartha, 2006).

## 2.2 *Streptococcus*

*Streptococcus* merupakan bakteri fakultatif anaerob gram positif yang membentuk pasangan atau rantai dalam pertumbuhannya. Jumlah spesies *Streptococcus* yang telah diidentifikasi mencapai lebih dari 30 spesies (Herwaldt, 2003). *Streptococcus* berbentuk lonjong atau bulat dengan diameter  $\pm 0,8-1,0 \mu\text{m}$ . Bakteri ini termasuk bakteri gram positif, tidak bergerak, tidak berspora, dan beberapa spesies membentuk kapsul. Beberapa spesies *Streptococcus* merupakan bakteri komensal pada rongga mulut, sedangkan beberapa spesies lainnya dihubungkan dengan penyakit infeksi pada manusia (Brooks *et al.*, 2007; Forbes, 2007).

*Streptococcus* dapat tumbuh dengan baik pada *enriched medium* (medium yang diperkaya) yaitu serum, darah, atau *transudate*, misalnya cairan asites. pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Streptococcus* adalah 7,4-7,6 dengan suhu optimal 37°C. *Streptococcus* dalam eksudat/sputum dapat hidup selama beberapa minggu. Pada suhu kamar dalam medium biasa, bakteri ini dapat hidup selama 10 hari hingga 2 minggu. Sebagian *Streptococcus* mati pada suhu 55°C selama 10 menit. Sementara, pada suhu minimal 60°C selama  $\pm 30-60$  menit, misalnya pada pasteurisasi 62°C selama  $\frac{1}{2}$  jam, semua spesies *Streptococcus* mati. Bakteri ini akan mati terhadap bahan kimia dalam kurun waktu 15 menit dalam fenol 1/200, tinctur iodium, kresol 1/75, heksilresorsinol 1/1000, dan merkurokrom 2%. *Streptococcus* juga sensitif terhadap obat-obatan, seperti *sulfonamide* dan *penicillin* (Dzen *dkk.*, 2003).

### 2.2.1 Klasifikasi *Streptococcus pyogenes* (Stephens, 2006)

Kingdom : Bacteria

Filum : Firmicutes

Kelas : Bacilli  
Ordo : Lactobacillales  
Famili : Streptococcaceae  
Genus : Streptococcus  
Spesies : *Streptococcus pyogenes*

### 2.2.2 *Streptococcus pyogenes*



**Gambar 2.2** *Streptococcus pyogenes* pada Pewarnaan Gram dengan Perbesaran 1000x (Schwan, 2007)

*Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri *Streptococcus* grup A yang bersifat  $\beta$ -hemolytic, yaitu pada media *blood agar* menyebabkan hemolisis seluruhnya (zona translusen) di sekitar koloni bakteri. Hemolisis tersebut disebabkan oleh kandungan hemolisin dalam Streptolisin O dan Streptolisin S. Bakteri ini juga bersifat katalase negatif dan fakultatif anaerob. Pada pewarnaan Gram (Gambar 2.2) tampak gram positif (berwarna ungu) dengan sel berderet menyerupai rantai, berbentuk lonjong dan bulat (Todar, 2008; Samaranayake, 2002).

*Streptococcus pyogenes* merupakan salah satu bakteri patogen yang menyusun sekitar 25% dari flora normal rongga mulut. Bakteri ini dapat ditemukan, terutama pada kulit, mukosa, dan saluran pernapasan, serta ditemukan pula pada *dental plaque* (Todar, 2008; Vichayanrat, 2004). Bakteri ini dapat dibedakan dari bakteri lainnya dengan beberapa cara. Tes pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan dengan bakteri gram positif dengan bakteri gram negatif. Bakteri diinokulasikan pada media cair, diinkubasi, lalu ditanam pada media *blood agar* untuk melihat sifat hemolisinya. Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri *Streptococcus* dengan *Staphylococcus*. Tes *bacitracin* digunakan untuk uji saring *Streptococcus* grup A (Dzen dkk., 2003).

### 2.2.3 Penentu Patogenitas dan Toksin

*Streptococcus pyogenes* menghasilkan sejumlah enzim dan eksotoksin. yaitu M (*monoclonal*) protein, *lipoteichoic acid (LTA)*, dan *fibronectin-binding protein* (protein F) berperan dalam adhesi bakteri pada sel *host*. M protein adalah protein yang dapat mengikat fibrinogen dari serum darah dan menghambat fagositosis. Kapsul *hyaluronic acid*, secara kimiawi mirip dengan jaringan ikat *host* sehingga bakteri tidak dapat dikenali sebagai antigen oleh *host* dan menghambat fagositosis. *Invasins*, dapat mengakibatkan lisis sel (termasuk sel eritrosit dan sel fagosit), makromolekul lain (termasuk enzim), serta mengakibatkan bakteri dapat menyebar pada jaringan dengan menghancurkan fibrin. *Pyrogenic exotoxin (erythrogenic toxin)* dapat menyebabkan *toxic shock-like syndrome* (Todar, 2008).

## 2.3 Infeksi Endodontik

### 2.3.1 Definisi

Infeksi endodontik adalah infeksi pada pulpa dan saluran akar gigi yang disebabkan oleh polimikroba, yang didominasi oleh bakteri anaerob dan beberapa bakteri fakultatif anaerob (Walton & Torabinejad, 2008; *American Association of Endodontics*, 2006)

### 2.3.2 Etiologi dan Patogenesis

Pada awalnya, mikroorganisme menginisiasi respon inflamasi. Toksin yang dihasilkan oleh bakteri merupakan awal dari invasi bakteri. Bila infeksi bakteri tersebut dibatasi oleh jaringan keras gigi, maka dentin sekunder yang bersifat reparatif dan protektif akan terbentuk. Tetapi, apabila pulpa sudah terbuka, maka tidak ada lagi pertahanan dari jaringan keras gigi. Oleh karena itu, invasi dan proliferasi bakteri menjadi lebih besar sehingga menyebabkan kolonisasi bakteri pada sistem saluran akar dan dapat menjangar ke jaringan periradikuler (Ahmad, 2012)

### 2.4 Perawatan Endodontik

Perawatan endodontik adalah perawatan yang berhubungan dengan diagnosa serta perawatan dari penyakit pulpa dan jaringan periapikal. Perawatan endodontik adalah suatu usaha mempertahankan gigi dari tindakan pencabutan gigi supaya gigi dapat bertahan dalam soket. Tujuan dari perawatan endodontik adalah pembersihan mikroba beserta produk-produk mikroba dan debris pulpa dari saluran akar (*American Association of Endodontics*, 2006.). Prinsip perawatannya meliputi preparasi, sterilisasi, dan pengisian saluran akar (Tronstad, 2003).

#### 2.4.1 Preparasi Saluran Akar

Tujuan preparasi saluran akar adalah menghilangkan iritan seperti, jaringan nekrotik, bakteri, serta produk bakteri. Prinsip preparasi saluran akar adalah mempertahankan bentuk saluran akar dan melebarkan bagian koronal saluran akar supaya memungkinkan dilakukan irigasi dan memperoleh ruang yang cukup untuk pengisian saluran akar (Samadi, 2002).

Pada tahap preparasi diperlukan irigasi saluran akar agar semua iritan di dalamnya ikut mengalir keluar bersama bahan irigasi (Tronstad, 2003). Tindakan irigasi saluran akar merupakan salah satu tahap penting perawatan endodontik karena bila diabaikan dapat mengakibatkan kegagalan perawatan. Dinding saluran akar yang tidak bersih dapat menjadi tempat persembunyian bakteri, mengurangi perlekatan bahan pengisi saluran akar, dan meningkatkan celah apikal. Selain itu, irigasi juga dapat membersihkan debris makanan bila saluran akar dibiarkan terbuka untuk drainase selama abses alveolar akut (Yanti, 2000).

Syarat bahan irigasi saluran akar yang ideal, yaitu dapat membunuh mikroorganisme, menghilangkan serpihan dentin, melarutkan jaringan nekrotik, mampu mengadakan penetrasi yang dalam, membasahi saluran akar, tidak merubah warna gigi, tidak berasa, tidak berbau, dan ekonomis (Walton & Torabinejad, 2008). Larutan irigasi yang paling baik yaitu mempunyai daya antimikroba maksimal dengan toksisitas minimal. Setiap bahan yang dipakai dalam bidang kedokteran gigi harus memenuhi syarat-syarat biokompatibilitas (dapat diterima oleh jaringan tubuh), yaitu tidak mengandung substansi yang dapat mengakibatkan respon sistemik bila berdifusi dan diabsorpsi ke dalam sistem sirkulasi, tidak membahayakan pulpa dan jaringan lunak, bebas dari agen sensitisasi yang dapat mengakibatkan respon alergi, serta tidak bersifat karsinogenik (Roberson, 2000). Bahan irigasi yang sering digunakan antara lain, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%,

NaOCl 3%, NaOCl 5,25%, EDTA 15%, *Chlorhexidine*, *aquadest*, *iodine*, dan klorin (Agustin, 2005).

#### 2.4.2 Sterilisasi Saluran Akar

Sterilisasi saluran akar merupakan salah satu tahap penting pada perawatan saluran akar karena bertujuan untuk membebaskan ruang pulpa dan saluran akar dari jasad renik. Tahap ini dilakukan setelah pembersihan ruang pulpa dan debris, pelebaran saluran akar, dan irigasi saluran akar (Whitworth & John M, 2002).

Syarat bahan sterilisasi saluran akar yang ideal, antara lain, efektif sebagai bakterisidal dan fungisidal, stabil dalam larutan, tidak mengiritasi jaringan periapikal dan periodontal, mempunyai efek antimikroba yang lama, tegangan permukaan rendah, tetap efektif walaupun dengan adanya serum, darah, dan derivat protein jaringan, tidak merubah warna gigi, tidak mengganggu perbaikan jaringan periapikal, tidak menyebabkan respon imun, serta dapat dinonaktifkan dalam media biakan. Bahan sterilisasi saluran akar antara lain, *eugenol*, *phenol*, *formocresol*, *cresol*, *parachlorophenol*, *iodine*, dan lain-lain (Grossman *et al.*, 1995).

#### 2.4.3 Pengisian Saluran Akar

Tujuan obturasi atau pengisian saluran akar adalah menciptakan kerapatan yang sempurna pada sistem saluran akar, dari korona hingga ke ujung apeks, untuk mencegah terjadinya reinfeksi. Bahan obturasi saluran akar biasanya bahan solid dan semi-solid (pasta). Bahan solid yang digunakan, antara lain, guttaperca, kon perak, dan kirgi. Bahan semi-solid yang digunakan, antara lain, ZnO eugenol (semen Grossman), AH26 (resin

epoksi), diaket (resin polivinil/poliketon),  $\text{Ca(OH)}_2$ , dan GIC (Walton & Torabinejad, 2008; Grossman *et al.*, 1995)

## 2.5 Ekstraksi

### 2.5.1 Ekstraksi dan Ekstrak

Ekstraksi adalah proses pengeluaran, pemisahan, atau penarikan suatu komponen campuran dari campurannya. Pelarut yang biasa digunakan disesuaikan dengan komponen yang diinginkan, cairan dipisahkan, dan diuapkan hingga mencapai kepekatan tertentu (Manan, 2008). Hasil dari ekstraksi disebut ekstrak yang terdiri dari berbagai macam unsur, tergantung bahan yang digunakan dan kondisi dari ekstraksi.

Ekstrak adalah sediaan sari pekat hewan atau tumbuhan yang diperoleh dengan cara melepaskan zat aktif dari tiap bahan dengan menggunakan *menstruum* yang sesuai, kemudian uapkan semua atau hampir semua dari pelarutnya, selanjutnya serbuk atau sisa endapan diatur untuk ditetapkan standarnya (Ansel, 2008).

### 2.5.2 *Menstruum*

*Menstruum* merupakan pelarut atau campuran pelarut yang digunakan dalam ekstraksi. Sistem pelarut yang digunakan dipilih berdasarkan kemampuan dalam melarutkan jumlah maksimal dari zat aktif dan minimal bagi unsur yang tidak diinginkan. Contoh *menstruum* adalah alkohol, air, gliserin, dan hidroalkohol. Asam asetat dan pelarut organik lain, misalnya eter, dapat digunakan untuk tujuan khusus (Ansel, 2008).

Kriteria *menstruum* yang baik menurut Gamse (2002), antara lain, bereaksi netral, stabil secara kimia dan fisika, murah dan mudah didapat, tidak mudah menguap dan terbakar, tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat, serta bersifat selektif (hanya

menarik zat yang diinginkan). *Menstruum* yang sering digunakan dalam ekstraksi, yaitu air dan etanol karena banyak bahan tumbuhan yang larut dalam etanol atau air sehingga etanol atau air menjadi acuan cairan pengekstraksi (Charuniza, 2012).

Etanol dipilih sebagai *menstruum* karena lebih selektif, netral, tidak beracun, absorpsi baik, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit, dan dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan. Campuran etanol dan air biasanya digunakan untuk meningkatkan pelarutan. Perbandingan jumlah air dan etanol tergantung pada bahan yang diekstrak (Gamse, 2002).

### 2.5.3 Metode Ekstraksi

Beberapa metode yang digunakan untuk ekstraksi dengan menggunakan pelarut adalah sebagai berikut (Sampurno, 2000):

#### 2.5.3.1 Cara Dingin

- a. *Maceration*, yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan atau pengocokan pada suhu ruangan (kamar). Dengan cara ini, zat-zat berkhasiat yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan dapat ditarik.
- b. *Percolation*, 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.

#### 2.5.3.2 Cara Panas

- a. *Reflux*, yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu, dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendinginan balik. Biasanya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama, yakni 3-5 kali sehingga termasuk proses ekstraksi sempurna.
- b. *Soxhlet*, yaitu proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru yang dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi *continue* dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendinginan balik.
- c. *Digestion*, yaitu proses ekstraksi maserasi kinetik (dengan pengadukan secara *continue*) pada suhu yang lebih tinggi dari suhu kamar (ruangan), umumnya pada suhu 40-50°C.
- d. *Infusion*, yaitu sediaan cair yang dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati dengan air pada temperatur 90°C selama 15-20 menit.
- e. *Decoction*, yaitu infus yang dibuat dengan waktu lebih lama hingga suhunya mencapai titik didih air.

## 2.6 Antibakteri

Antibakteri berdasarkan sifatnya dibagi menjadi dua macam, yaitu desinfektan dan antiseptik. Antiseptik adalah bahan yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik), sedangkan desinfektan dapat menghambat pertumbuhan serta membunuh bakteri dengan cara menghancurkan dinding sel bakteri (bakterisid) (Katzung, 2001).

Bahan antibakteri yang baik adalah bahan yang efektif membunuh kuman tetapi tidak mengiritasi jaringan sekitarnya (Newman, 2001). Aktivitas antibakteri *in vitro*

dipengaruhi beberapa faktor, yaitu komponen media, ukuran inokulum, stabilitas inokulum, pH lingkungan, waktu inkubasi, dan aktivitas metabolik bakteri (Tanu, 2007). Konsentrasi terendah dari antibakteri yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut konsentrasi hambat minimal (KHM), ditunjukkan dengan tidak adanya endapan atau kekeruhan pada tabung yang berisi inokulum bakteri. Konsentrasi terendah dari antibakteri yang dapat membunuh bakteri disebut konsentrasi bunuh minimal (KBM). KBM ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri atau kurang dari 0,1% *original inoculum* pada medium agar yang berisi inokulum bakteri yang sudah dilakukan *streaking* dengan bahan antibakteri yang tidak menunjukkan kekeruhan sebanyak satu ose (Dzen dkk., 2003).

Mekanisme kerja bahan antibakteri terhadap bakteri antara lain dengan cara mendenaturasi protein, antara lain, merusak molekul asam nukleat dan protein sehingga dapat merusak sel dan tidak dapat diperbaiki kembali, merusak dinding sel, yaitu dengan menghambat pembentukan dinding sel atau dengan mengubah struktur dinding sel setelah dibentuk, mengganggu permeabilitas membran sel, yaitu dengan cara merusak membran sitoplasma sehingga aliran keluar masuknya bahan-bahan terganggu dan integritas komponen seluler rusak, menghambat kerja enzim, yaitu dengan cara mengganggu reaksi kimia yang melibatkan enzim-enzim dalam sel sehingga menyebabkan terganggunya metabolisme atau matinya sel, serta menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Tanu, 2007).

### 2.6.1 Resistensi Bakteri Terhadap Antibiotik

Resistensi bakteri terhadap antibiotik yaitu kemampuan bakteri yang berubah menjadi kebal terhadap antibiotik, diakibatkan perubahan sifat bakteri sehingga tidak

dapat lagi dibunuh (WHO, 2011). Secara biokimia, resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat terjadi dengan mekanisme, antara lain, inaktivasi antibiotik oleh enzim yang dihasilkan bakteri, modifikasi reseptor obat, meningkatnya sintesa senyawa yang antagonistik terhadap obat, dan berkurangnya permeabilitas mikroba terhadap obat (Sjahrurachman, 2006).

Menurut para peneliti dari Universitas New York, beberapa bakteri patogen mampu menghasilkan *nitric oxide* yang dapat memproduksi enzim yang membuat bakteri resisten terhadap antibiotik. Kemudian, bakteri yang kebal tersebut dengan cepat berkembang biak dan membuat koloni baru dan makin sulit dibunuh (Mulyatno, 2013).

Berdasarkan penelitian, *Streptococcus pyogenes* sensitif terhadap antibiotik golongan beta laktam, seperti *penicillin*, demikian pula *erythromycin*, *clindamycin*, *imipenem*, *rifampin*, *vancomycin*, *macrolides* and *lincomycin*. Tetapi, beberapa strain bakteri telah ditemukan resisten terhadap *fluoroquinolones*, *macrolides*, *lincomycin*, *chloramphenicol*, *tetracyclines*, dan *cotrimoxazole* (Bessen, 2009; Cohen *et al.*, 2005; Arai *et al.*, 2000; Canton *et al.*, 2002; Arvand *et al.*, 2000)

### 2.6.2 Uji Antibakteri

Kemampuan antibakteri serta kepekaan bakteri terhadap suatu bahan yang diberikan dapat ditentukan dengan pengukuran aktivitas antibakteri suatu bahan secara *in vitro*. Penentuan aktivitas antibakteri secara *in vitro* dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu (Forbes, 2007) :

- a. Metode Dilusi

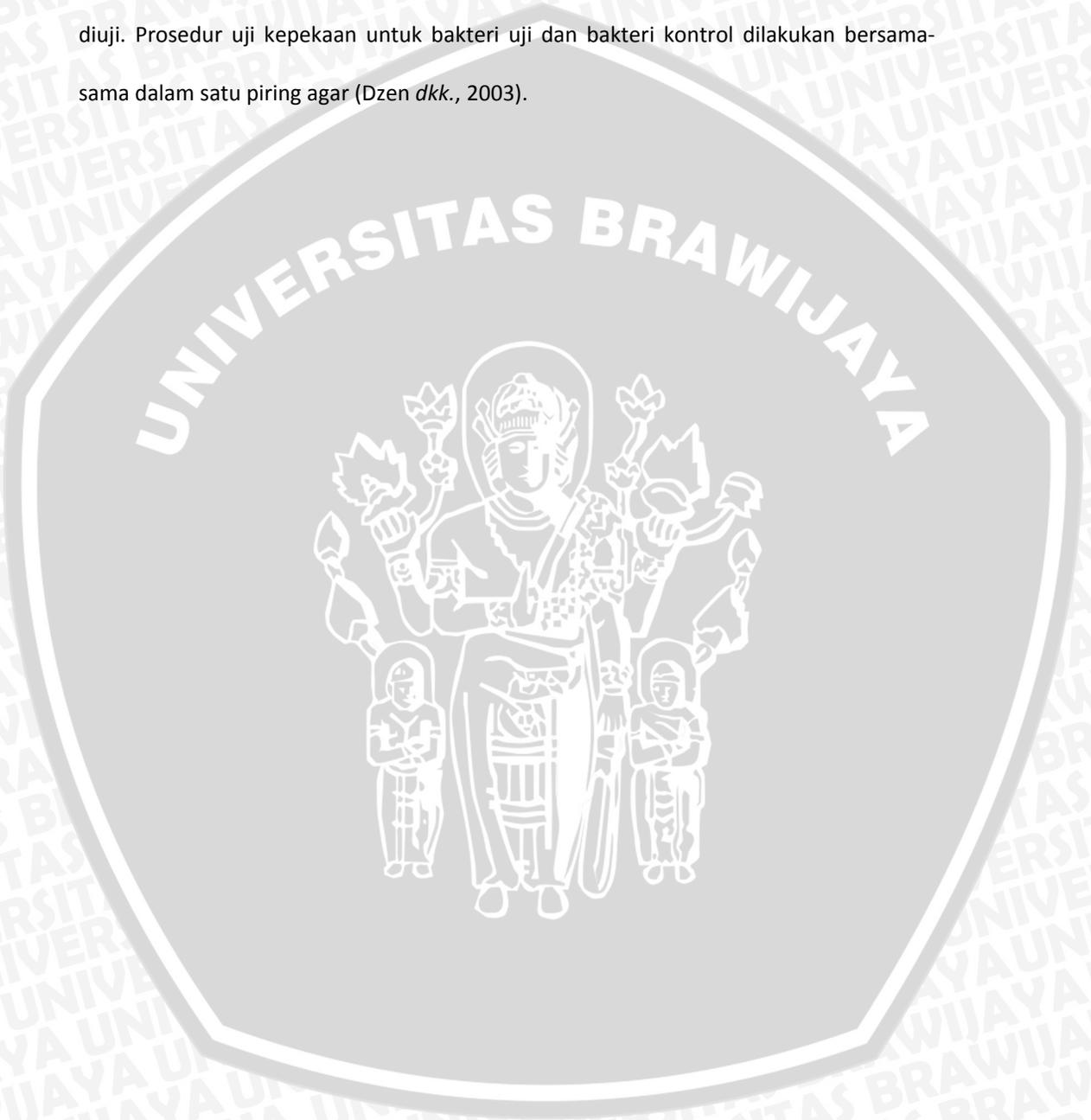
Metode ini memerlukan larutan antibakteri yang telah dilakukan pengenceran secara seri, yaitu dengan cara mengencerkan bahan antibakteri dengan media cair sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi berkelipatan setengah. Kemudian pada masing-masing tabung dimasukkan 0,1 ml atau 1 ml inokulum standar. Dua tabung digunakan sebagai kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif diisi inokulum dan media, sedangkan kontrol negatif diisi media tanpa inokulum. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan masing-masing tabung diamati kekeruhannya. Tabung yang jernih menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri. Hasil yang didapat dari tiap tabung ditanam pada media agar untuk melihat pertumbuhan koloni bakteri. Dengan metode ini dapat ditentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) (Bagg *et al.*, 2006).

b. Metode Difusi

Metode ini digunakan untuk menguji beberapa bahan antibakteri terhadap suatu bakteri. Media padat diinokulasi dengan bakteri uji, kemudian pada media tersebut dibuat lubang. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian bahan antibakteri yang akan diuji ditempatkan pada lubang yang telah dibuat. Setelah dilakukan inkubasi, dilakukan pengamatan terhadap daerah hambatan atau zona radikal di sekeliling tempat diletakkannya bahan antibakteri (Kusmayati dan Agustini, 2007).

Terdapat dua cara untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan isolat bakteri terhadap bahan antibakteri, antara lain, cara *Kirby Bauer*, yaitu dengan membandingkan diameter zona hambat (area jernih) di sekitar cakram dengan tabel standar NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Dengan tabel NCCLS dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet, dan resisten. Kemudian, cara *Joan-Stokes*, yaitu dengan

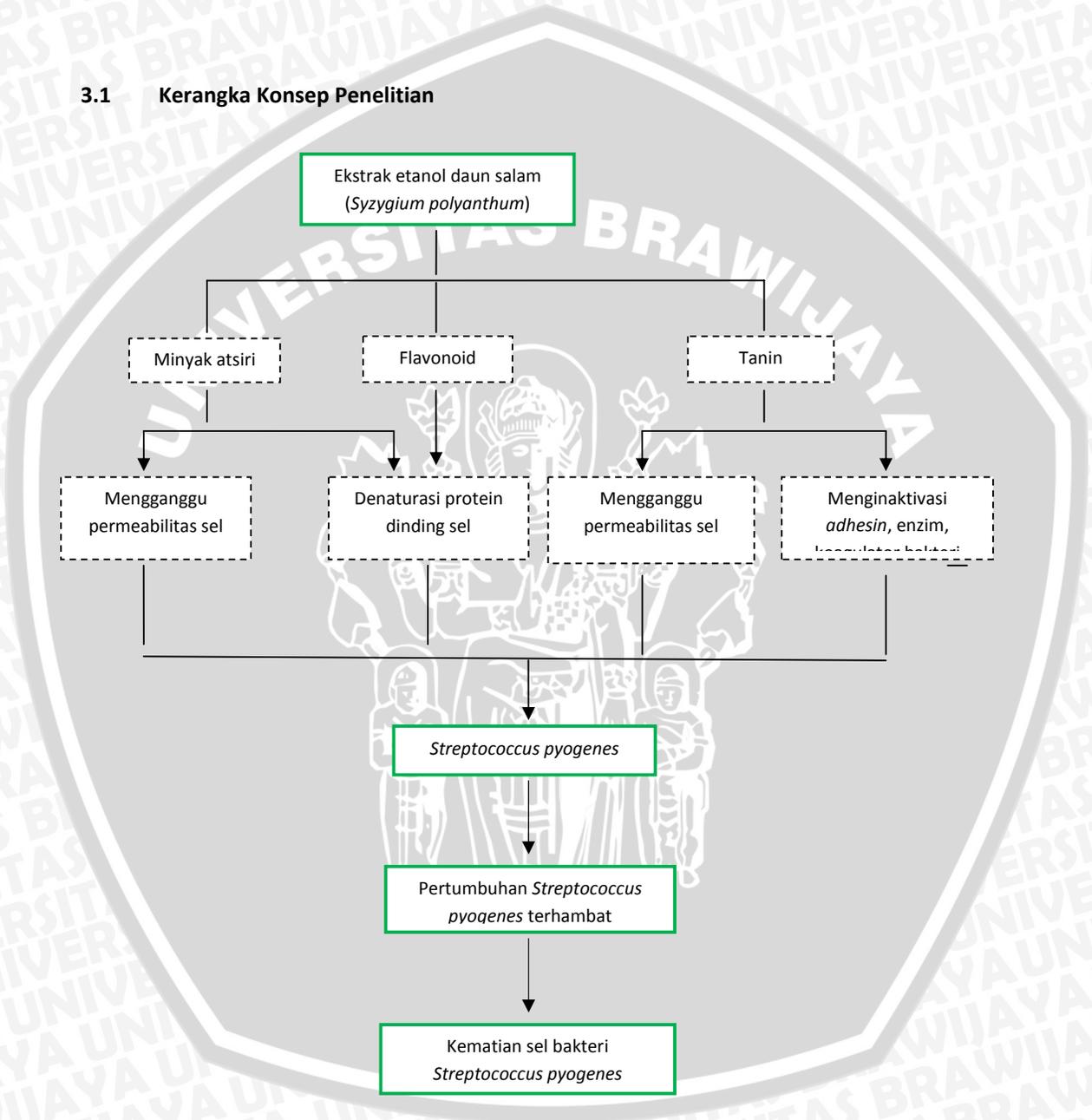
membandingkan radius zona hambat yang terjadi antara bakteri dan kontrol yang telah diketahui kepekaannya terhadap bahan antibakteri tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Prosedur uji kepekaan untuk bakteri uji dan bakteri kontrol dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen *dkk.*, 2003).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :



: variabel yang diteliti

----- variabel yang tidak diteliti

Daun salam (*Syzygium polyanthum*) yang diekstrak dengan pelarut etanol dapat menarik tiga zat yang bersifat sebagai antibakteri, yaitu minyak atsiri, tanin, dan *flavonoid*. Minyak atsiri bekerja dengan berinteraksi dengan membran sel bakteri sehingga menyebabkan peningkatan permeabilitas sel dan denaturasi protein sehingga struktur protein berubah dan terjadi koagulasi. Perubahan struktur protein pada membran sel dapat mengganggu permeabilitas sel sehingga menghambat pertumbuhan sel dan kemudian sel menjadi rusak. *Flavonoid* bekerja dengan cara mendenaturasi protein dan asam nukleat. Denaturasi tersebut mengakibatkan koagulasi protein serta mengganggu permeabilitas membran dan fungsi fisiologis bakteri terganggu. Tanin bekerja dengan menyebabkan pengkerutan dinding sel bakteri sehingga mengganggu permeabilitas sel. Selain itu, tanin juga dapat menginaktivasi *adhesin* bakteri, enzim, koagulator bakteri sehingga mengakibatkan aktivitas fisiologis sel bakteri terganggu. Ekstrak etanol daun salam yang mengandung ketiga senyawa tersebut (minyak atsiri, *flavonoid*, dan tanin) diuji terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*. Selanjutnya, mengamati pengaruh ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* dan kematian sel bakteri *Streptococcus pyogenes*.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*true experiment-post test only control group design*) dengan menggunakan metode dilusi tabung dan dilusi agar.

## 4.2 Populasi dan Sampel

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

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

$$\approx 4$$

(Notobroto, 2005)

Keterangan :

p = jumlah perlakuan (7 perlakuan, yaitu 6 konsentrasi ekstrak etanol daun salam dan kontrol positif)

n = jumlah pengulangan ( 4 kali pengulangan)

#### 4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 **Variabel Bebas** : Ekstrak etanol daun salam dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%.

4.3.2 **Variabel Tergantung** : Tingkat pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang dilaksanakan dari bulan Agustus 2013 sampai Desember 2013.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain, *petri dish* , mikroskop, pipet, tabung reaksi, rak tabung, gelas ukur, *vortex*, *beaker glass*, tabung *Erlenmeyer*, corong *Buchner*, bunsen, *falcon*, ose, inkubator, *rotary evaporator*, *analytical balance*, *autoclave*, *colony counter*, dan spektrofotometer.

#### 4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain, daun salam (*Syzygium polyanthum*), *Streptococcus pyogenes*, media *Nutrient Broth*, media *Nutrient Agar* (NA), alkohol 96%, NaCl 0,9%, kristal violet, lugol, safranin, *aquadest*, minyak imersi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, dan *bacitracin disk*.

#### 4.6 Definisi Operasional

- a. Daun salam yang digunakan didapat dari Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur, UPT Materia Medica Batu.
- b. Ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) adalah ekstrak yang diperoleh dari daun salam yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan, direndam dalam etanol 96%, diaduk, didiamkan, dan diambil filtratnya dengan penyaringan yang kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 60°C.
- c. *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri grup  $\beta$ -hemolitik dengan karakteristik pada *Blood Agar Plate* berupa zona yang translusen, pada pewarnaan Gram terlihat berwarna ungu, pada tes katalase tidak menunjukkan adanya gelembung udara, dan pada tes *bacitracin* menunjukkan adanya zona hambat > 15 mm di sekitar *bacitracin disk*.
- d. KHM (konsentrasi hambat minimum) atau MIC (*minimum inhibitory concentration*) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun salam yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, ditandai dengan tidak terdapatnya

kekeruhan pada larutan ekstrak daun salam yang telah diberi bakteri uji dalam media *nutrient broth*. Bila tidak dapat diamati, KHM dicari dengan metode dilusi agar yang ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri secara kasat mata.

- e. KBM (konsentrasi bunuh minimum) atau MBC (*minimum bactericidal concentration*) adalah konsentrasi terendah ekstrak daun salam yang mampu membunuh bakteri uji (*Streptococcus pyogenes*). KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau kurang dari 0,1% *Original Inoculum* (OI).
- f. *Original Inoculum* (OI) yaitu suspensi bakteri dengan kepadatan  $10^6$  CFU/ml yang kemudian sebelum diinkubasi di-*streaking* pada media agar padat dan digunakan untuk mencari nilai KBM .

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Identifikasi Bakteri

###### a. Pewarnaan Gram

Satu ose akuades steril diteteskan pada gelas objek, lalu diambil sedikit bakteri untuk disuspensi dengan *aquadest* yang telah diletakkan di atas gelas objek, lalu dibiarkan kering di udara. Suspensi bakteri yang sudah kering difiksasi dengan cara melewatkannya beberapa kali di atas api. Sediaan siap untuk diwarnai. Kristal violet diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air. Lugol diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air. Alkohol 96% diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air. Safranin diteteskan pada

sediaan dan ditunggu selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap. Sediaan dilihat di bawah mikroskop. Bila hasil positif (berwarna ungu), dinyatakan sebagai bakteri Gram positif. Bila hasil negatif (berwarna merah), dinyatakan sebagai bakteri Gram negatif.

**b. Tes Katalase**

Gelas objek dibersihkan dengan kapas, lalu dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak, kemudian dibiarkan dingin. Membuat sediaan perbenihan cair bakteri pada gelas objek. Sediaan ditetesi larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Mengamati ada tidaknya gelembung udara yang terjadi. Bila hasil tes katalase positif (tidak ada gelembung udara, dinyatakan sebagai bakteri *Staphylococcus*. Bila hasil tes katalase negatif (ada gelembung udara), dinyatakan sebagai bakteri *Streptococcus*.

**c. Tes Bacitracin**

Melakukan *streaking* bakteri *Streptococcus pyogenes* pada *Blood Agar Plate* (BAP). *Bacitracin disk* diletakkan di tengah inokulum dengan penjepit. Posisi *disk* diatur dengan menekan *disk* secara perlahan pada permukaan agar, tetapi *disk* tidak dibenamkan dalam agar. *Disk* diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Mengamati zona hambatan pada sekeliling *disk*. Jika terdapat zona hambat > 15 mm, hasil diidentifikasi sebagai *Streptococcus pyogenes* (Kumar, 2012).

**4.7.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan menggunakan media *Nutrient Broth*. Mengambil 5 koloni ( $d \geq 1$  mm) dengan ose, lalu dimasukkan ke

dalam 5 ml *Nutrient Both*. Selanjutnya, mengukur *Optical Density* (OD) dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  maks. = 625 nm. Dari hasil yang diperoleh kemudian membuat suspensi yang mengandung  $10^8$  CFU/ml dengan rumus  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ . Untuk mendapatkan suspensi bakteri yang mengandung  $10^6$ CFU/ml, maka dilakukan dengan mengambil 1 ml suspensi  $10^8$  CFU/ml dan ditambah dengan 9 ml NaCl 0,9%, maka akan didapatkan suspensi dengan konsentrasi  $10^7$  CFU/ml. Penambahan tersebut diulangi sekali lagi sampai didapatkan konsentrasi suspensi bakteri  $10^6$  CFU/ml.

#### **4.7.3 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*)**

Daun salam segar (daun yang masih muda dan berada kira-kira 3 tangkai paling ujung) dipisahkan dari batangnya, kemudian dicuci bersih dan dikeringkan hingga benar-benar kering (diangin-anginkan di dalam ruangan), digiling hingga halus, didapatkan serbuk daun salam dan ditimbang sebanyak 500 gram. Serbuk kemudian direndam dalam etanol 96% hingga seluruh bagian terbenam selama 24 jam, kemudian disaring dengan corong *Buchner* sampai didapatkan filtrat yang terpisah dari ampasnya. Perendaman dan penyaringan tersebut diulang sebanyak 3 kali. Kemudian, ketiga filtrat tersebut dijadikan satu, lalu etanolnya diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu  $60^\circ\text{C}$  selama  $\pm 1$  jam hingga menjadi ekstrak kental dengan konsentrasi 100%. Ekstrak etanol daun salam murni dimasukkan ke dalam botol steril, tutup rapat, dan disimpan di tempat yang sejuk.

#### **4.7.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap *Streptococcus pyogenes* dengan Metode Dilusi Tabung**

- a. Menyediakan 8 tabung steril yaitu, 6 tabung sebagai uji antibakteri dan 1 tabung sebagai kontrol kuman, serta 1 tabung sebagai kontrol bahan. Konsentrasi yang digunakan adalah 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%.
- b. Tabung 1 (KK) berisi suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* ditambahkan *aquadest* (kontrol kuman). Tabung 2 (0,5%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,005 ml ditambahkan 0,995 ml *aquadest*. Tabung 3 (1%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,01 ml ditambahkan 0,99 ml *aquadest*. Tabung 4 (1,5%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,015 ml ditambahkan 0,985 ml *aquadest*. Tabung 5 (2%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,02 ml ditambahkan 0,98 ml *aquadest*. Tabung 6 (2,5%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,025 ml ditambahkan 0,975 ml *aquadest*. Tabung 7 (3%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,03 ml ditambahkan 0,97 ml *aquadest*. Tabung 8 (KB) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% tanpa penambahan bakteri *Streptococcus pyogenes* (kontrol bahan).
- c. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung (kecuali tabung kontrol bahan), masing-masing sejumlah 1 ml.
- d. Kontrol kuman (0%) digoreskan pada media NA sebagai *Original Inoculum*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- e. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- f. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung dibantu dengan latar belakang berupa 5 garis hitam yang berbeda ketebalannya. Kekeuhan tidak dapat diamati sehingga KHM didapatkan dengan metode dilusi agar.

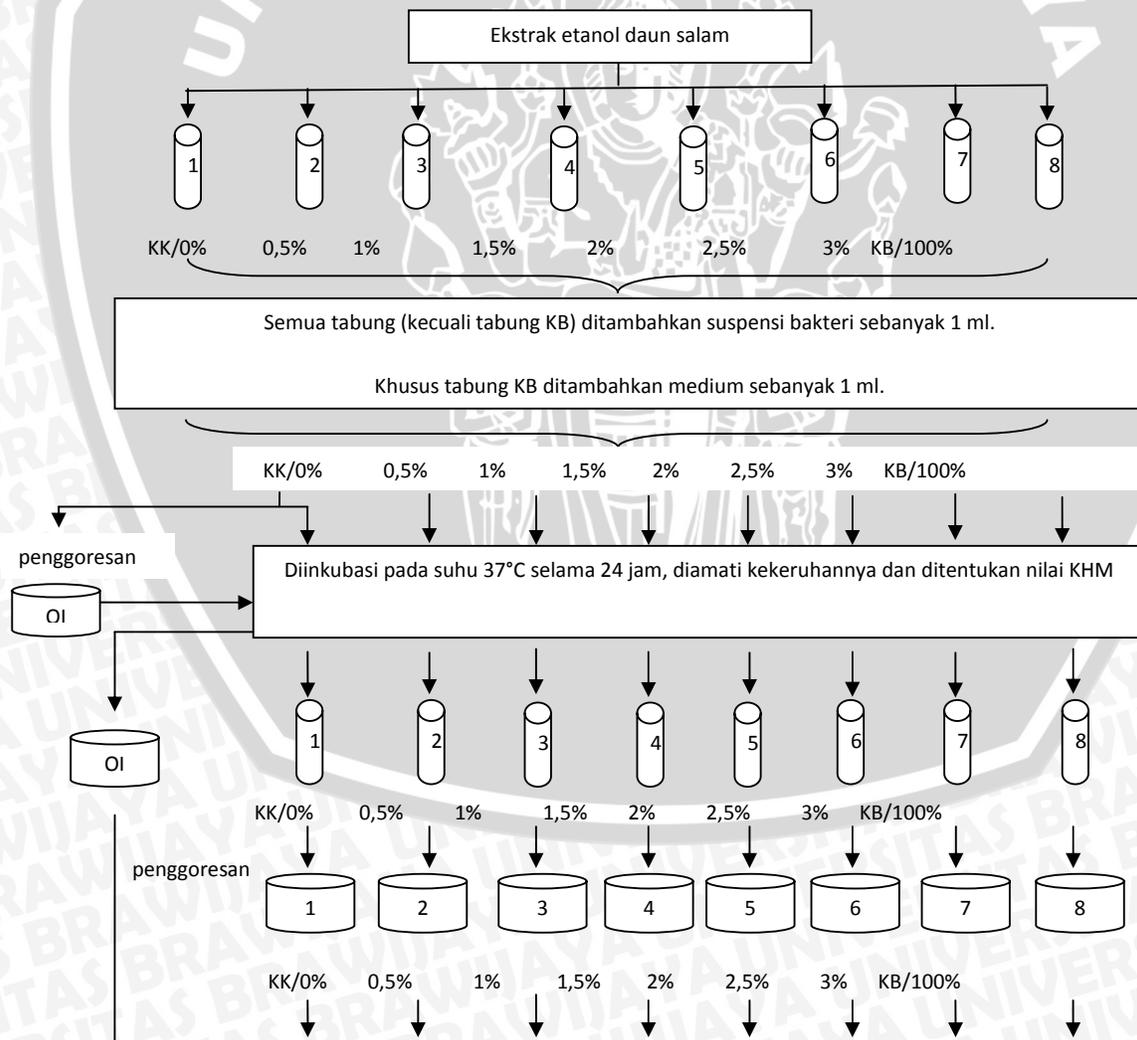
- g. Selanjutnya dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose, lalu di-streaking pada media NA. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- h. Pada hari ketiga, data KBM didapatkan dan pada masing-masing konsentrasi dilakukan pengamatan kuantitatif dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri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

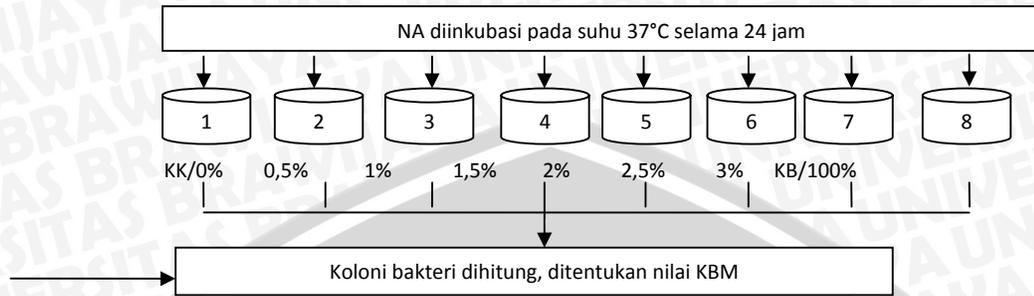
#### **4.7.5 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap *Streptococcus pyogenes* Menggunakan Metode Dilusi Agar**

- a. Menyediakan 7 plate steril berdiameter 9 cm, 6 plate sebagai uji antibakteri dan 1 plate sebagai kontrol kuman. Konsentrasi yang digunakan adalah 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%.
- b. Volume total yang digunakan pada setiap plate untuk mencampur agar dengan ekstrak adalah 15 ml.
- c. Plate 1 (KK) berisi 15 ml agar tanpa penambahan ekstrak etanol daun salam (kontrol kuman). Plate 2 (0,5%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,075 ml ditambah 14,925 ml agar. Plate 3 (1%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,15 ml ditambah 14,85 ml agar. Plate 4 (1,5%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,225 ml ditambah 14,755 ml agar. Plate 5 (2%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,3 ml ditambah 14,7 ml agar. Plate 6 (2,5%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,375 ml ditambah 14,625 ml agar. Plate 7 (3%) berisi ekstrak etanol daun salam konsentrasi 100% sejumlah 0,45 ml ditambah 14,55 ml agar.

- d. Setelah agar dingin, setiap plate dibagi 4. Pada setiap kuadran ditetesi bakteri uji, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- e. Semua plate dikeluarkan dari inkubator. KHM ditentukan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri secara kasat mata.

**4.7.6 Kerangka Operasional Penelitian Metode Dilusi Tabung**



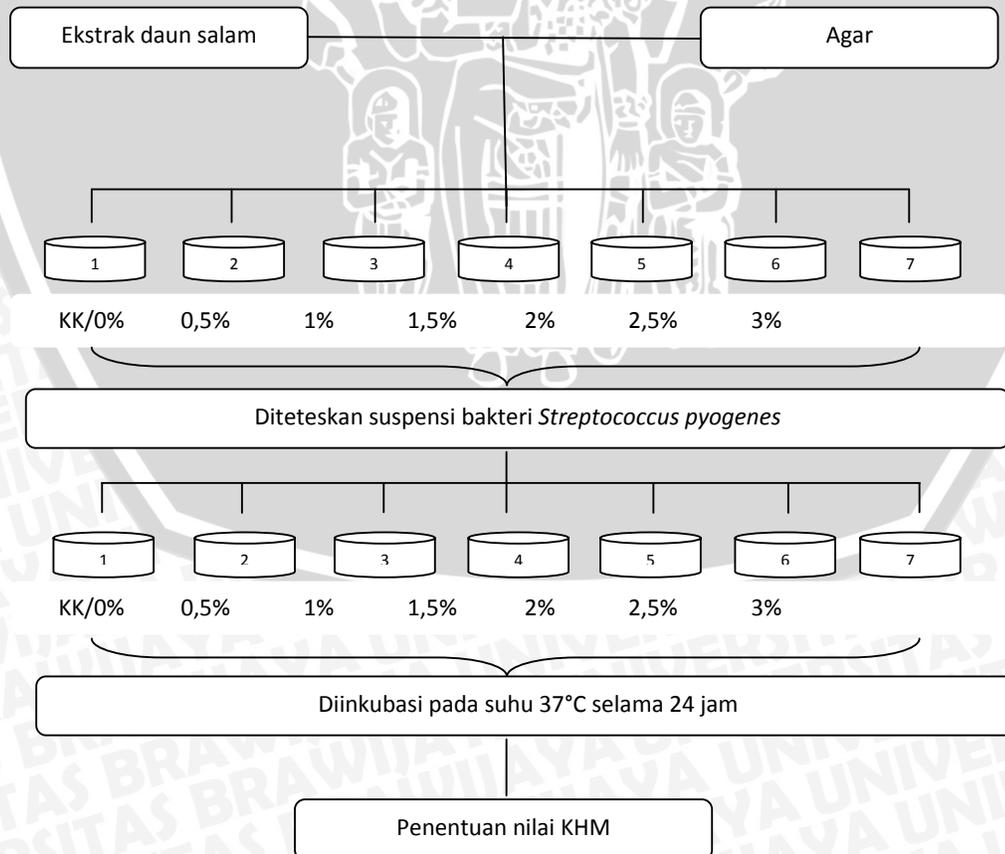


**Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian Metode Dilusi Tabung**

Keterangan :

- KK : Kontrol kuman
- KB : Kontrol bahan
- OI : *Original Inoculum*

**4.7.7 Kerangka Operasional Penelitian Metode Dilusi Agar**



**Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian Metode Dilusi Agar**

Keterangan :

KK : Kontrol kuman

#### 4.8 Analisis Data

Analisa data yang digunakan adalah uji *one-way Anova* dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Syarat dilakukan uji *one-way Anova* yaitu bila data terdistribusi normal dan homogen. Untuk mengetahui arah dan kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap tingkat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* menggunakan uji korelasi-regresi. Analisa data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 12.0.

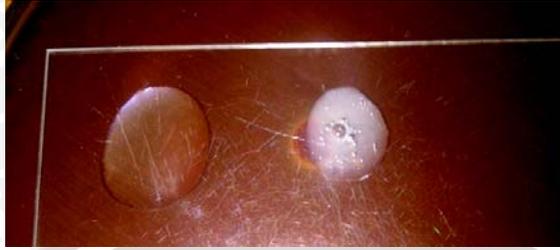
## BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Identifikasi *Streptococcus pyogenes*

**Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram *Streptococcus pyogenes***

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada kemudian dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri digunakan, dilakukan identifikasi untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah *Streptococcus pyogenes*. Setelah dilakukan tes pewarnaan Gram (Gambar 5.1), pada pengamatan mikroskop dengan perbesaran 1000x, terlihat bakteri berwarna ungu, bulat, dan membentuk rantai. Berdasarkan tes tersebut diketahui bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif.



**Gambar 5.2 Hasil Tes Katalase *Streptococcus pyogenes* (kiri)**

Pada tes katalase (Gambar 5.2) didapatkan hasil negatif, dimana tidak terlihat adanya gelembung udara. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *Streptococcus*.



**Gambar 5.3 Hasil Tes *Bacitracin Streptococcus pyogenes***

Pada tes *bacitracin* (Gambar 5.3) terdapat zona hambat > 15 mm di sekitar *bacitracin disk* yang diletakkan pada BAP. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *Streptococcus pyogenes*.

## 5.2 Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*)

Serbuk kering daun salam yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari UPT Materia Medica Batu, Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur. Daun salam diekstrak menggunakan metode maserasi dan didapatkan ekstrak etanol daun salam sebanyak 15 ml. Kemudian dilakukan uji sterilisasi ekstrak etanol daun salam dengan melakukan *streaking* pada *nutrient agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada hasil uji sterilisasi tidak didapatkan adanya pertumbuhan bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun salam sudah steril.

### 5.3 Hasil Uji Dilusi Tabung

Dari hasil uji dilusi tabung, tampak adanya endapan pada seluruh tabung dengan berbagai konsentrasi. Oleh karena itu, Kadar Hambat Minimum (KHM) terhadap *Streptococcus pyogenes* tidak dapat dilihat melalui metode dilusi tabung sehingga dilanjutkan menggunakan metode dilusi agar untuk menentukan KHM ekstrak etanol daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes*.

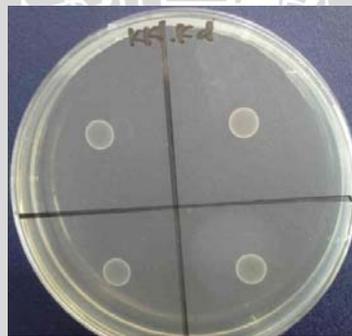


#### Gambar 5.4 Hasil Pengamatan KHM dengan Metode Dilusi Tabung

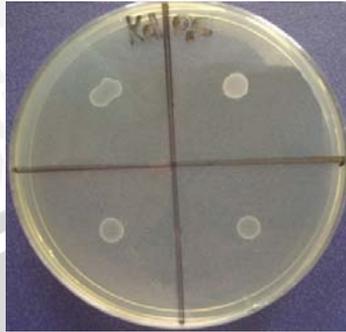
- Keterangan (kiri-kanan) : - Kontrol Kuman (KK) dilusi tabung
- Dilusi tabung dengan konsentrasi 0,5%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 1%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 1,5%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 2%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 2,5%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 3%
  - Kontrol Bahan (KB) dilusi tabung

#### 5.4 Hasil Penelitian KHM dengan Metode Dilusi Agar

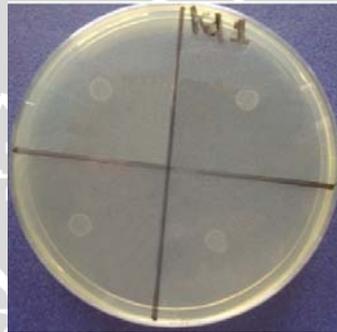
Penelitian ini menggunakan enam konsentrasi ekstrak etanol daun salam, yaitu 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%, serta satu kontrol kuman tanpa pemberian ekstrak daun salam. Penentuan KHM dilakukan dengan melakukan pengamatan menggunakan mata telanjang. Konsentrasi ekstrak daun salam yang dicampurkan pada media NA terendah yang tidak terdapat pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes* merupakan Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* (Gambar 5.9).



Gambar 5.5 Kontrol Kuman (KK) Dilusi Agar



Gambar 5.6 Konsentrasi 0,5% Dilusi Agar

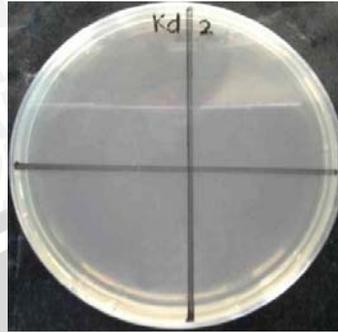


Gambar 5.7 Konsentrasi 1% Dilusi Agar

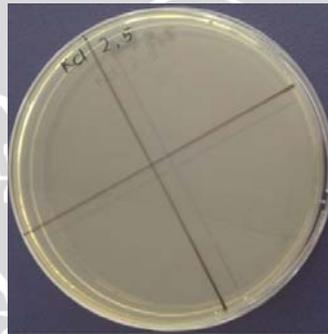


Gambar 5.8 Konsentrasi 1,5% Dilusi Agar

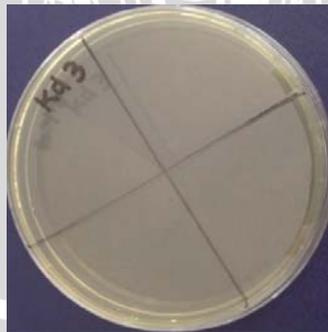




Gambar 5.9 Konsentrasi 2% Dilusi Agar



Gambar 5.10 Konsentrasi 2,5% Dilusi Agar



Gambar 5.11 Konsentrasi 3% Dilusi Agar

Gambar 5.5 hingga Gambar 5.11 adalah hasil dari uji dilusi agar ekstrak etanol daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes*. Pada kontrol kuman (KK) (Gambar 5.5) terlihat adanya koloni bakteri yang sangat tebal. Hal ini menunjukkan bahwa suspensi bakteri yang digunakan memang mengandung bakteri. Setelah suspensi bakteri diteteskan pada media agar yang telah dicampur berbagai konsentrasi ekstrak daun salam dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, terlihat penurunan pertumbuhan koloni yang sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam. Skor hasil pengamatan uji dilusi agar ekstrak etanol daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* dapat dilihat pada Tabel 5.1.

**Tabel 5.1 Hasil Pengamatan KHM dengan Metode Dilusi Agar**

Skoring Pertumbuhan Bakteri				
Konsentrasi	Pengulangan			
	I	II	III	IV
0% (KK)	+3	+3	+3	+3
0,5%	+3	+3	+3	+3
1%	+2	+2	+2	+2

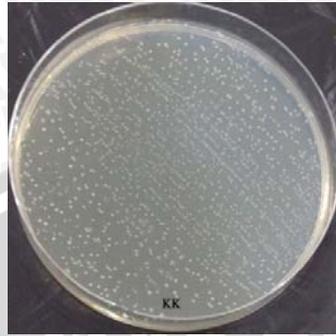
1,5%	+1	+1	+1	+1
2%	0	0	0	0
2,5%	0	0	0	0
3%	0	0	0	0

Keterangan :  
 +3 : koloni tumbuh sangat tebal  
 +2 : koloni tumbuh tebal  
 +1 : koloni tumbuh tipis  
 0 : tidak ada pertumbuhan

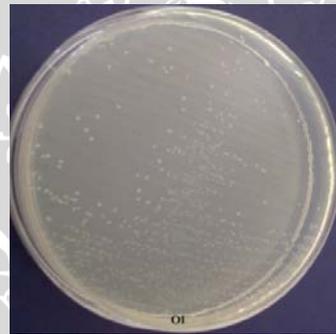
Berdasarkan hasil pengamatan pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada agar *plate* yang mengandung beberapa konsentrasi ekstrak daun salam (Tabel 5.1), terjadi pengurangan pertumbuhan koloni bakteri yang sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam. Pada konsentrasi 2% mulai tidak terlihat adanya pertumbuhan koloni bakteri, maka dapat ditentukan bahwa KHM ekstrak daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* terletak pada konsentrasi 2%. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa pemberian perlakuan berupa ekstrak daun salam mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*.

### 5.5 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *Streptococcus Pyogenes*

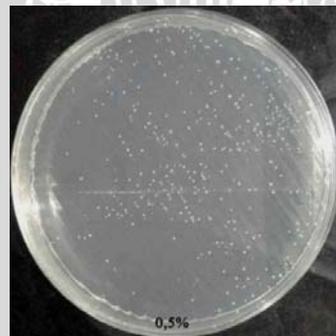
Perhitungan koloni *Streptococcus pyogenes* pada media NA dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada tiap plate yang berisi media NA yang telah di-*streaking* dengan biakan *Streptococcus pyogenes* dan ekstrak daun salam dengan berbagai konsentrasi (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%) yang sebelumnya telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Gambar 5.12 hingga Gambar 5.19).



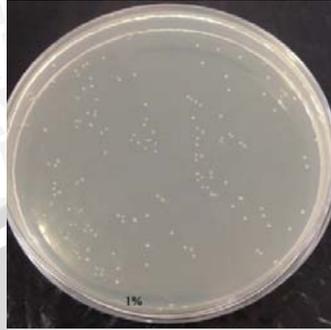
Gambar 5.12 Kontrol Kuman (KK) Dilusi Tabung



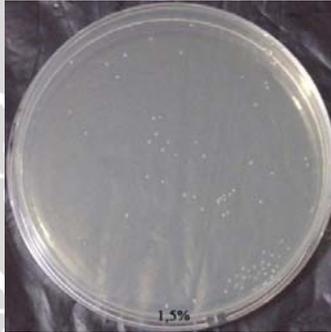
Gambar 5.13 *Original Inoculum* (OI) Dilusi Tabung



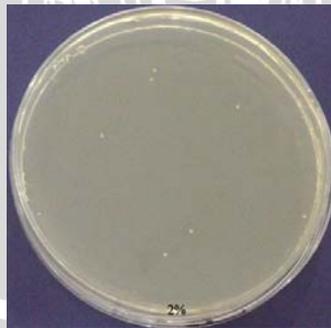
Gambar 5.14 Konsentrasi 0,5% Dilusi Tabung



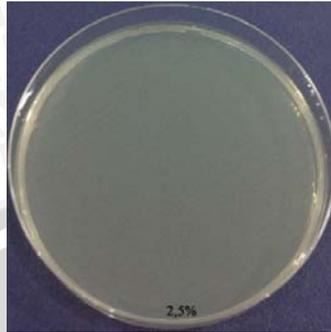
Gambar 5.15 Konsentrasi 1% Dilusi Tabung



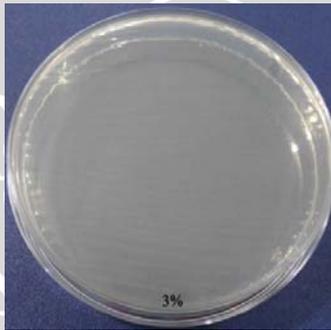
Gambar 5.16 Konsentrasi 1,5% Dilusi Tabung



Gambar 5.17 Konsentrasi 2% Dilusi Tabung



Gambar 5.18 Konsentrasi 2,5% Dilusi Tabung



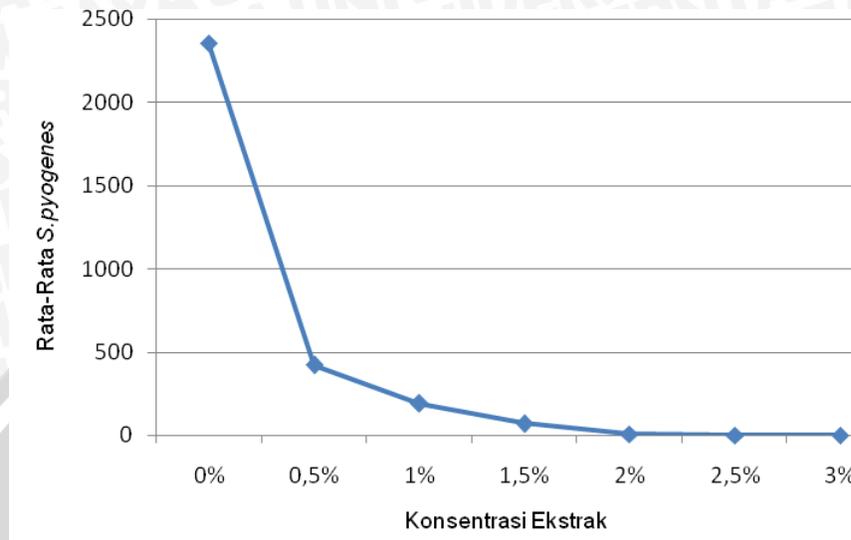
Gambar 5.19 Konsentrasi 3% Dilusi Tabung

Tujuan dari pengamatan ini adalah untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes*. KBM ekstrak daun salam ditentukan dari konsentrasi dimana jumlah koloni yang tumbuh kurang dari 0,1% jumlah koloni yang tumbuh pada OI (*Original Inoculum*). Perhitungan jumlah koloni bakteri dilakukan dengan alat *colony counter*. Hasil penghitungan koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada media NA dari berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 5.2.

**Tabel 5.2 Hasil Perhitungan Koloni *Streptococcus pyogenes* Pada Media Nutrient Agar**

Konsentrasi	Pengulangan (CFU/plate)				Jumlah (CFU/plate)	Rata-rata (CFU/plate)
	I	II	III	IV		
0% (KK)	2631	2415	1984	2395	9425	2356,25
0,5%	458	426	397	403	1684	421
1%	221	198	169	181	769	192,25
1,5%	96	68	59	62	285	71,25
2%	5	7	8	7	27	6,75
2,5%	0	0	0	0	0	0
3%	0	0	0	0	0	0

Berdasarkan hasil penelitian yang tercantum pada Gambar 5.12 dan Tabel 5.2, dapat dilihat bahwa pada kontrol kuman (KK) terlihat adanya jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang sangat tinggi. Jumlah koloni yang tinggi juga terdapat pada konsentrasi ekstrak daun salam 0,5% pada setiap pengulangan yang dilakukan, sedangkan pada konsentrasi 2,5% dan 3% tidak didapatkan adanya pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Pada Gambar 5.12 hingga Gambar 5.19 dapat dilihat bahwa dari empat kali pengulangan tidak menunjukkan perbedaan jumlah koloni yang terlalu signifikan pada tiap konsentrasi ekstrak daun salam.



**Gambar 5.20** Jumlah Rata-Rata Koloni *S.pyogenes* Setelah Pemberian Berbagai Konsentrasi Ekstrak Daun Salam

Pada Gambar 5.20 didapatkan adanya penurunan jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* dari hasil empat kali pengulangan pada tiap konsentrasi ekstrak daun salam. Selain itu, dapat diamati pula bahwa setiap peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam disertai dengan gradasi penurunan jumlah pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Pada konsentrasi 2,5% dan 3% tidak terlihat adanya pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*, sedangkan pada konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2% terlihat perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun salam mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat dilihat bahwa dengan seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak daun salam, terjadi penurunan jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada media NA, dimana pada konsentrasi ekstrak daun salam 2,5% dan 3% tidak didapatkan adanya pertumbuhan koloni *Streptococcus*

*pyogenes*. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* adalah pada konsentrasi 2,5%.

## 5.6 Analisis Data

### 5.6.1 Uji *One-Way* ANOVA

Syarat menggunakan uji *one-way* ANOVA yaitu data terdistribusi normal yaitu bila nilai signifikansi  $p > 0,05$ , serta variansi data homogen yaitu bila nilai signifikansi  $p > 0,05$ . Bila tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, terlebih dahulu dilakukan transformasi data.

Uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* (Lampiran 3) dilakukan untuk mengetahui distribusi data normal atau tidak. Berdasarkan uji normalitas data diperoleh nilai signifikansi 0,886 ( $p > 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Uji homogenitas data menggunakan uji *Levene Homogeneity Test* (Lampiran 3) dilakukan untuk mengetahui variansi data homogen atau tidak. Berdasarkan uji homogenitas data diperoleh nilai signifikansi 0,386 ( $p > 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa variansi data adalah homogen. Berdasarkan hasil kedua uji tersebut, data yang diperoleh memenuhi syarat untuk dilakukan uji *one-way* ANOVA.

Berdasarkan hasil uji *one-way* ANOVA (Lampiran 3), diperoleh nilai signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti efek pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun salam terhadap jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* terdapat perbedaan signifikan pada taraf kepercayaan 95%.

Uji *Post Hoc Tukey* merupakan uji pembandingan berganda (*Multiple Comparison Test*), bertujuan untuk menunjukkan pasangan kelompok konsentrasi yang memberikan perbedaan signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan signifikan. Berdasarkan

hasil uji *Post Hoc Tukey* (Lampiran 3), diketahui bahwa terdapat perbedaan signifikan pada setiap pasangan kelompok konsentrasi yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $< 0,05$  ( $p < 0,05$ ).

### 5.6.2 Uji Korelasi-Regresi

Uji korelasi digunakan untuk mengetahui hubungan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun salam terhadap jumlah koloni *Streptococcus pyogenes*. Hasil uji Korelasi *Pearson* (Lampiran 3) menunjukkan nilai signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak daun salam terhadap jumlah koloni bakteri. Besarnya koefisien korelasi antara -1 s/d 1. Bila nilainya mendekati -1 atau 1, maka hubungan kedua variabel tersebut sangat kuat, sedangkan bila nilainya 0 berarti tidak terdapat hubungan kedua variabel tersebut. Besar koefisien korelasi *Pearson* adalah  $R = -0,721$ . Tanda negatif menunjukkan hubungan terbalik, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun salam maka semakin sedikit jumlah pertumbuhan koloni bakteri. Nilai 0,712 menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara perlakuan konsentrasi dengan pertumbuhan bakteri. Besar koefisien korelasi yang mendekati -1 menunjukkan bahwa terdapat hubungan kedua variabel kuat negatif.

Uji Regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam dalam menghambat pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Berdasarkan hasil uji Regresi (Lampiran 3), nilai *R Square* ( $R^2$ ) adalah 0,520 menunjukkan bahwa kontribusi pemberian ekstrak etanol daun salam dalam menurunkan jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* sebesar 52%, sedangkan sisanya 48% disebabkan oleh faktor lain yang tidak diteliti. Faktor-faktor tersebut,

misalnya, kualitas dalam penyimpanan alat-alat pada laboratorium, lama penyimpanan ekstrak, suhu tempat penyimpanan ekstrak, atau resistensi bakteri itu sendiri. Rumus umum koefisien Regresi yaitu  $Y = a + bX$ . Dimana nilai konstanta (a), koefisien Regresi (b), variabel bebas (X), variable terikat (Y). Hubungan antara konsentrasi ekstrak daun salam terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dapat dinyatakan dengan rumus  $Y = 1302,813 - 578,304X$ , dimana Y adalah jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*, sedangkan X adalah konsentrasi ekstrak daun salam. Dari persamaan ini dapat diinterpretasikan bahwa setiap peningkatan dosis ekstrak sebesar 1% akan diiringi penurunan jumlah koloni secara signifikan sebanyak 578,304 koloni bakteri.



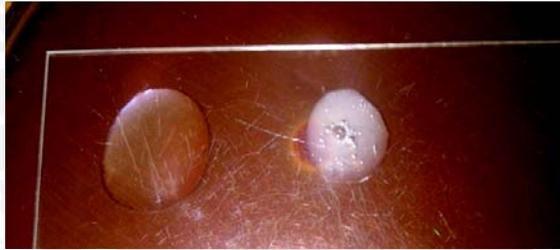
## BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Identifikasi *Streptococcus pyogenes*

**Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram *Streptococcus pyogenes***

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada kemudian dikultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri digunakan, dilakukan identifikasi untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah *Streptococcus pyogenes*. Setelah dilakukan tes pewarnaan Gram (Gambar 5.1), pada pengamatan mikroskop dengan perbesaran 1000x, terlihat bakteri berwarna ungu, bulat, dan membentuk rantai. Berdasarkan tes tersebut diketahui bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif.



**Gambar 5.2 Hasil Tes Katalase *Streptococcus pyogenes* (kiri)**

Pada tes katalase (Gambar 5.2) didapatkan hasil negatif, dimana tidak terlihat adanya gelembung udara. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *Streptococcus*.



**Gambar 5.3 Hasil Tes *Bacitracin Streptococcus pyogenes***

Pada tes *bacitracin* (Gambar 5.3) terdapat zona hambat > 15 mm di sekitar *bacitracin disk* yang diletakkan pada BAP. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah *Streptococcus pyogenes*.

## 5.2 Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*)

Serbuk kering daun salam yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari UPT Materia Medica Batu, Dinas Kesehatan Propinsi Jawa Timur. Daun salam diekstrak menggunakan metode maserasi dan didapatkan ekstrak etanol daun salam sebanyak 15 ml. Kemudian dilakukan uji sterilisasi ekstrak etanol daun salam dengan melakukan *streaking* pada *nutrient agar* (NA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada hasil uji sterilisasi tidak didapatkan adanya pertumbuhan bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun salam sudah steril.

### 5.3 Hasil Uji Dilusi Tabung

Dari hasil uji dilusi tabung, tampak adanya endapan pada seluruh tabung dengan berbagai konsentrasi. Oleh karena itu, Kadar Hambat Minimum (KHM) terhadap *Streptococcus pyogenes* tidak dapat dilihat melalui metode dilusi tabung sehingga dilanjutkan menggunakan metode dilusi agar untuk menentukan KHM ekstrak etanol daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes*.

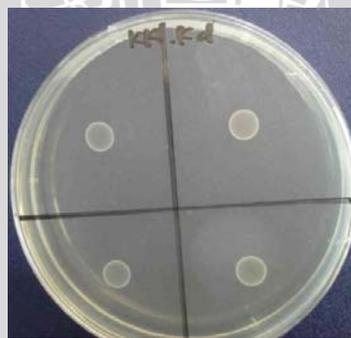


#### Gambar 5.4 Hasil Pengamatan KHM dengan Metode Dilusi Tabung

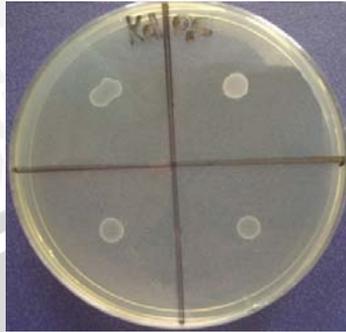
- Keterangan (kiri-kanan) : - Kontrol Kuman (KK) dilusi tabung
- Dilusi tabung dengan konsentrasi 0,5%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 1%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 1,5%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 2%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 2,5%
  - Dilusi tabung dengan konsentrasi 3%
  - Kontrol Bahan (KB) dilusi tabung

#### 5.4 Hasil Penelitian KHM dengan Metode Dilusi Agar

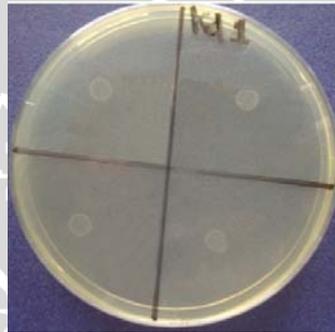
Penelitian ini menggunakan enam konsentrasi ekstrak etanol daun salam, yaitu 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%, serta satu kontrol kuman tanpa pemberian ekstrak daun salam. Penentuan KHM dilakukan dengan melakukan pengamatan menggunakan mata telanjang. Konsentrasi ekstrak daun salam yang dicampurkan pada media NA terendah yang tidak terdapat pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes* merupakan Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* (Gambar 5.9).



Gambar 5.5 Kontrol Kuman (KK) Dilusi Agar



Gambar 5.6 Konsentrasi 0,5% Dilusi Agar

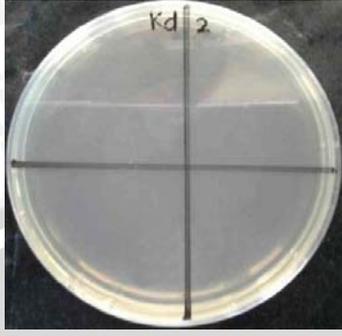


Gambar 5.7 Konsentrasi 1% Dilusi Agar

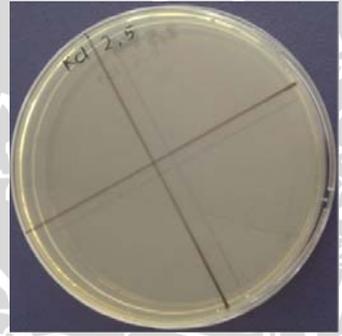


Gambar 5.8 Konsentrasi 1,5% Dilusi Agar

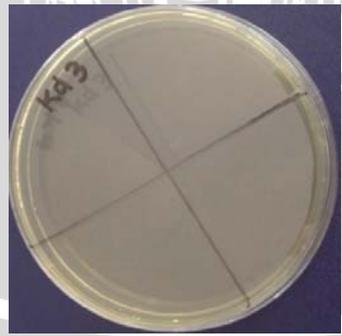




Gambar 5.9 Konsentrasi 2% Dilusi Agar



Gambar 5.10 Konsentrasi 2,5% Dilusi Agar



Gambar 5.11 Konsentrasi 3% Dilusi Agar



Gambar 5.5 hingga Gambar 5.11 adalah hasil dari uji dilusi agar ekstrak etanol daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes*. Pada kontrol kuman (KK) (Gambar 5.5) terlihat adanya koloni bakteri yang sangat tebal. Hal ini menunjukkan bahwa suspensi bakteri yang digunakan memang mengandung bakteri. Setelah suspensi bakteri diteteskan pada media agar yang telah dicampur berbagai konsentrasi ekstrak daun salam dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, terlihat penurunan pertumbuhan koloni yang sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam. Skor hasil pengamatan uji dilusi agar ekstrak etanol daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* dapat dilihat pada Tabel 5.1.

**Tabel 5.1 Hasil Pengamatan KHM dengan Metode Dilusi Agar**

Skoring Pertumbuhan Bakteri				
Konsentrasi	Pengulangan			
	I	II	III	IV
0% (KK)	+3	+3	+3	+3
0,5%	+3	+3	+3	+3
1%	+2	+2	+2	+2

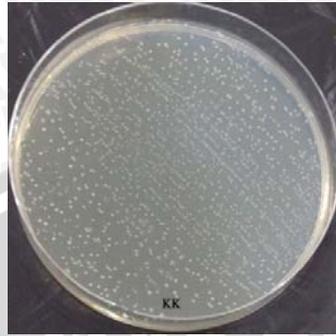
1,5%	+1	+1	+1	+1
2%	0	0	0	0
2,5%	0	0	0	0
3%	0	0	0	0

Keterangan :  
 +3 : koloni tumbuh sangat tebal  
 +2 : koloni tumbuh tebal  
 +1 : koloni tumbuh tipis  
 1 : tidak ada pertumbuhan

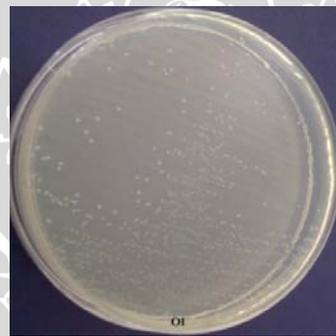
Berdasarkan hasil pengamatan pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* pada agar *plate* yang mengandung beberapa konsentrasi ekstrak daun salam (Tabel 5.1), terjadi pengurangan pertumbuhan koloni bakteri yang sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam. Pada konsentrasi 2% mulai tidak terlihat adanya pertumbuhan koloni bakteri, maka dapat ditentukan bahwa KHM ekstrak daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* terletak pada konsentrasi 2%. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa pemberian perlakuan berupa ekstrak daun salam mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*.

### 5.5 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *Streptococcus Pyogenes*

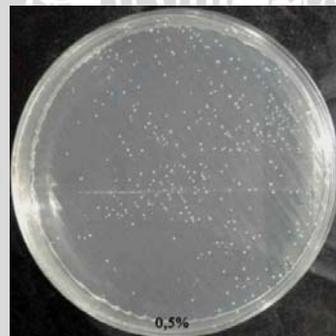
Perhitungan koloni *Streptococcus pyogenes* pada media NA dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada tiap plate yang berisi media NA yang telah di-*streaking* dengan biakan *Streptococcus pyogenes* dan ekstrak daun salam dengan berbagai konsentrasi (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, dan 3%) yang sebelumnya telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Gambar 5.12 hingga Gambar 5.19).



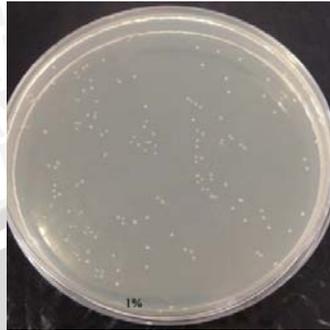
Gambar 5.12 Kontrol Kuman (KK) Dilusi Tabung



Gambar 5.13 *Original Inoculum* (OI) Dilusi Tabung



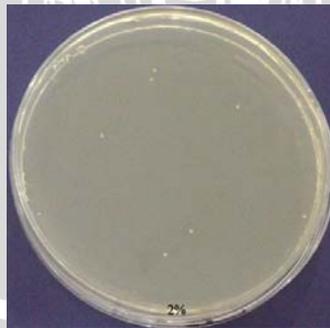
Gambar 5.14 Konsentrasi 0,5% Dilusi Tabung



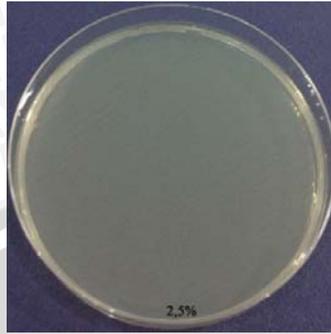
Gambar 5.15 Konsentrasi 1% Dilusi Tabung



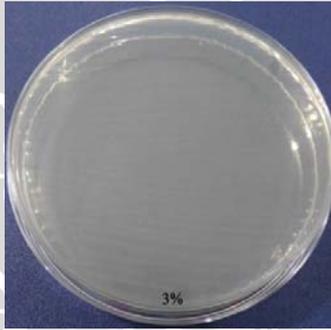
Gambar 5.16 Konsentrasi 1,5% Dilusi Tabung



Gambar 5.17 Konsentrasi 2% Dilusi Tabung



Gambar 5.18 Konsentrasi 2,5% Dilusi Tabung



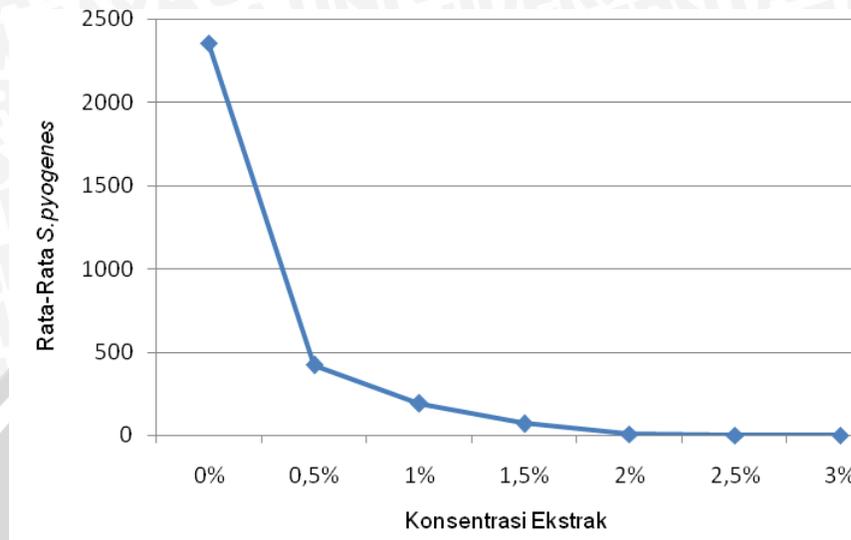
Gambar 5.19 Konsentrasi 3% Dilusi Tabung

Tujuan dari pengamatan ini adalah untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes*. KBM ekstrak daun salam ditentukan dari konsentrasi dimana jumlah koloni yang tumbuh kurang dari 0,1% jumlah koloni yang tumbuh pada OI (*Original Inoculum*). Perhitungan jumlah koloni bakteri dilakukan dengan alat *colony counter*. Hasil penghitungan koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada media NA dari berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 5.2.

**Tabel 5.2 Hasil Perhitungan Koloni *Streptococcus pyogenes* Pada Media Nutrient Agar**

Konsentrasi	Pengulangan (CFU/plate)				Jumlah (CFU/plate)	Rata-rata (CFU/plate)
	I	II	III	IV		
0% (KK)	2631	2415	1984	2395	9425	2356,25
0,5%	458	426	397	403	1684	421
1%	221	198	169	181	769	192,25
1,5%	96	68	59	62	285	71,25
2%	5	7	8	7	27	6,75
2,5%	0	0	0	0	0	0
3%	0	0	0	0	0	0

Berdasarkan hasil penelitian yang tercantum pada Gambar 5.12 dan Tabel 5.2, dapat dilihat bahwa pada kontrol kuman (KK) terlihat adanya jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang sangat tinggi. Jumlah koloni yang tinggi juga terdapat pada konsentrasi ekstrak daun salam 0,5% pada setiap pengulangan yang dilakukan, sedangkan pada konsentrasi 2,5% dan 3% tidak didapatkan adanya pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Pada Gambar 5.12 hingga Gambar 5.19 dapat dilihat bahwa dari empat kali pengulangan tidak menunjukkan perbedaan jumlah koloni yang terlalu signifikan pada tiap konsentrasi ekstrak daun salam.



**Gambar 5.20** Jumlah Rata-Rata Koloni *S.pyogenes* Setelah Pemberian Berbagai Konsentrasi Ekstrak Daun Salam

Pada Gambar 5.20 didapatkan adanya penurunan jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* dari hasil empat kali pengulangan pada tiap konsentrasi ekstrak daun salam. Selain itu, dapat diamati pula bahwa setiap peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam disertai dengan gradasi penurunan jumlah pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Pada konsentrasi 2,5% dan 3% tidak terlihat adanya pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*, sedangkan pada konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2% terlihat perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun salam mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, dapat dilihat bahwa dengan seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak daun salam, terjadi penurunan jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* yang tumbuh pada media NA, dimana pada konsentrasi ekstrak daun salam 2,5% dan 3% tidak didapatkan adanya pertumbuhan koloni *Streptococcus*

*pyogenes*. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak daun salam terhadap *Streptococcus pyogenes* adalah pada konsentrasi 2,5%.

## 5.6 Analisis Data

### 5.6.1 Uji *One-Way* ANOVA

Syarat menggunakan uji *one-way* ANOVA yaitu data terdistribusi normal yaitu bila nilai signifikansi  $p > 0,05$ , serta variansi data homogen yaitu bila nilai signifikansi  $p > 0,05$ . Bila tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, terlebih dahulu dilakukan transformasi data.

Uji normalitas data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* (Lampiran 3) dilakukan untuk mengetahui distribusi data normal atau tidak. Berdasarkan uji normalitas data diperoleh nilai signifikansi 0,886 ( $p > 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa data terdistribusi normal. Uji homogenitas data menggunakan uji *Levene Homogeneity Test* (Lampiran 3) dilakukan untuk mengetahui variansi data homogen atau tidak. Berdasarkan uji homogenitas data diperoleh nilai signifikansi 0,386 ( $p > 0,05$ ) yang menunjukkan bahwa variansi data adalah homogen. Berdasarkan hasil kedua uji tersebut, data yang diperoleh memenuhi syarat untuk dilakukan uji *one-way* ANOVA.

Berdasarkan hasil uji *one-way* ANOVA (Lampiran 3), diperoleh nilai signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti efek pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun salam terhadap jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* terdapat perbedaan signifikan pada taraf kepercayaan 95%.

Uji *Post Hoc Tukey* merupakan uji pembandingan berganda (*Multiple Comparison Test*), bertujuan untuk menunjukkan pasangan kelompok konsentrasi yang memberikan perbedaan signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan signifikan. Berdasarkan

hasil uji *Post Hoc Tukey* (Lampiran 3), diketahui bahwa terdapat perbedaan signifikan pada setiap pasangan kelompok konsentrasi yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $< 0,05$  ( $p < 0,05$ ).

### 5.6.2 Uji Korelasi-Regresi

Uji korelasi digunakan untuk mengetahui hubungan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun salam terhadap jumlah koloni *Streptococcus pyogenes*. Hasil uji Korelasi *Pearson* (Lampiran 3) menunjukkan nilai signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak daun salam terhadap jumlah koloni bakteri. Besarnya koefisien korelasi antara -1 s/d 1. Bila nilainya mendekati -1 atau 1, maka hubungan kedua variabel tersebut sangat kuat, sedangkan bila nilainya 0 berarti tidak terdapat hubungan kedua variabel tersebut. Besar koefisien korelasi *Pearson* adalah  $R = -0,721$ . Tanda negatif menunjukkan hubungan terbalik, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun salam maka semakin sedikit jumlah pertumbuhan koloni bakteri. Nilai 0,712 menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara perlakuan konsentrasi dengan pertumbuhan bakteri. Besar koefisien korelasi yang mendekati -1 menunjukkan bahwa terdapat hubungan kedua variabel kuat negatif.

Uji Regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun salam dalam menghambat pertumbuhan koloni *Streptococcus pyogenes*. Berdasarkan hasil uji Regresi (Lampiran 3), nilai *R Square* ( $R^2$ ) adalah 0,520 menunjukkan bahwa kontribusi pemberian ekstrak etanol daun salam dalam menurunkan jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* sebesar 52%, sedangkan sisanya 48% disebabkan oleh faktor lain yang tidak diteliti. Faktor-faktor tersebut,

misalnya, kualitas dalam penyimpanan alat-alat pada laboratorium, lama penyimpanan ekstrak, suhu tempat penyimpanan ekstrak, atau resistensi bakteri itu sendiri. Rumus umum koefisien Regresi yaitu  $Y = a + bX$ . Dimana nilai konstanta (a), koefisien Regresi (b), variabel bebas (X), variable terikat (Y). Hubungan antara konsentrasi ekstrak daun salam terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dapat dinyatakan dengan rumus  $Y = 1302,813 - 578,304X$ , dimana Y adalah jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes*, sedangkan X adalah konsentrasi ekstrak daun salam. Dari persamaan ini dapat diinterpretasikan bahwa setiap peningkatan dosis ekstrak sebesar 1% akan diiringi penurunan jumlah koloni secara signifikan sebanyak 578,304 koloni bakteri.



## BAB 7

## KESIMPULAN DAN SARAN

## 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) mempunyai efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.
2. Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap *Streptococcus pyogenes* terletak pada konsentrasi 2%.
3. Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap *Streptococcus pyogenes* terletak pada konsentrasi 2,5%.

## 7.2 Saran

Adapun saran yang peneliti berikan dari penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui zat aktif utama yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar terhadap bakteri uji.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui dosis efektif, dosis lethal, dosis toksik, dan efek samping, serta penelitian terhadap manusia.
3. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai aplikasi daun salam sebagai alternatif bahan irigasi dan obat sterilisasi saluran akar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Accugen Labs. 2011. *Minimum Inhibitory Concentration Test / MIC*. (Online). (<http://www.accugenlabs.com/mic.html>. diakses 22 Desember 2013).
- Agustin, D. 2005. *Perbedaan Khasiat Antibakteri Bahan Irigasi antara Hidrogen Peroksida 3% dan Infusum Daun Sirih 20% terhadap Bakteri mix*. Majalah Kedokteran Gigi (Dent. J.) 38(1): 45-47.
- Agustin, E.T. 2007. *Daya Antibakteri Ekstrak Buah Mahkota Dewa (Phaleria Macrocarpa) Terhadap Bakteri Streptococcus Alpha Haemolyticus*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ahmad, Irfan. 2012. *Prosthodontics at A Glance*. Oxford: Wiley-Blackwell. p.49.
- Ajizah, A. 2004. *Sensitivitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L*. Bioscientiae Vol. 1 No. 1. hal. 31-38.
- Akiyama, H. Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. 2001. *Antibacterial Action of Several Tannins against Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 48(4): 487-491.
- Al-Hamadani, A.H., Al-Yasiri R.K., Manky M.A., Al-Jannat M.A. 2011. *Evaluation of The Antimicrobial Effect of Endodontic Sealers on Microbiota Associated with Root Canal Infections*. QMJ vol. 7 no. 12. p. 1-12.
- American Association of Endodontics. 2006. *Antibiotics and The Treatment of Endodontic Infections*. Endodontics: Colleagues for Excellence.
- Ansel, H.C. 2008. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Jakarta: UI-Press. hal. 606-9, 617.
- Arai, K. et al., 2011. *Emergence of Fluoroquinolones-Resistant Streptococcus pyogenes in Japan by A Point Mutation Leading to A New Amino Acid Substitution*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Vol. 66. p: 494-498.
- Arvand, M., Hoeck, M., Hahn, H., Wagner, J. 2000. *Antimicrobial Resistance in Streptococcus pyogenes Isolates in Berlin*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 46 (4): 621-624.
- Bagg, J., Mac Farlane, T.W., Poxton, I.R., Smith, A.J. 2006. *Essentials of Microbiology for Dental Students 2<sup>nd</sup> ed*. Glasgow: Oxford University Press. p. 115-116.
- Bessen, D.E. 2009. *Population Biology of The Human Restricted Pathogen, Streptococcus pyogenes*. Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. 9(4), 581-593.

- Brook, I. 2002. *Microbiology of Polymicrobial Abscesses and Implications for Therapy*. J Antimicrobial Chemother 50(6): 805-10.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A. 2007. *Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology 24<sup>th</sup> ed.* New York: Mc Graw Hill. p. 233, 239-241.
- Canton, R., Loza, E., Morosini, M.I., Baquero, F. 2002. *Antimicrobial Resistance Amongst Isolates of Streptococcus pyogenes and Staphylococcus aureus in The PROTEKT Antimicrobial Surveillance Programme During 1999–2000*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy Vol. 50 Suppl. S1. p: 9-24.
- Charuniza, D.P.S. 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.
- Cohen, R., et al. 2005. *Streptococcus pyogenes an Emerging Pathogen*. Archives De Pediatrie : Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie. 12(7): 1065-1067.
- Dalimartha, S. 2006. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 2*. Jakarta: Trubus Agriwidya. hal. 162-165.
- Deny. 2007. *Pemanfaatan Tanin Sebagai Perekat*. Jurnal Penelitian Fakultas Teknologi Institut Pertanian Bogor.
- Dewanti, S., Wahyudi, S. 2011. *Uji Aktivitas Antimikroba Infusum Daun Salam (Syzygium polyanthum W.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia Coli secara In Vitro*. Jurnal Medika Planta Vol. 1 No. 4. hal: 78-81.
- Dzen, SM., Roekistiningsih, Sanarto, S., Winarsih, S. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedia Publishing.
- Forbes, A Berty. 2007. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 12<sup>th</sup> ed.* St.Louis: Mosby. p. 270.
- Gamse, T. 2002. *Liquid-Liquid Extraction and Solid-Liquid Extraction*. Institute of Thermal Process and Environmental Engineering Graz University of Technology, Austria. hal. 2-24.
- Gantz, N.M . 2006. *Manual of Clinical Problems in Infectious Disease 5<sup>th</sup> ed.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p 475.
- Grossman, L.I., Oliet, S., Rio, C.E.D. 1995. *Ilmu Endodontik Dalam Praktek edisi 11*. Jakarta: EGC.

- Hardiyanti, W.R. 2010. *Efek Antimikroba Ekstrak Daun Salam (Eugenia polyantha Wight.) Terhadap Bakteri Escherichia Coli dengan Metode Dilusi Agar*. Tugas akhir. Tidak diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Herwaldt, LA. 2003. *Staphylococcus aureus Nasal Carriage and Surgical Site Infections*. Surgery. 134 (Suppl 5) : 2-9.
- Ingle, J.I, Bakland L.K. 2002. *Endodontics 5<sup>th</sup> ed*. London: B.C. Decker Inc. p. 67-69.
- Katzung, B.G. 2001. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Salemba Medika. hal. 3-16.
- Krisnawati, I. 2008. *Healing Food for Kids*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. hal. 10.
- Kumar, S. 2012. *Textbook of Microbiology*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publisher Ltd. p. 248.
- Kurniawati, N. 2010. *Sehat dan Cantik Alami Berkat Khasiat Bumbu Dapur*. Bandung: Qanita. hal. 90.
- Kusmayati, Agustini, N. W. R. 2007. *Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga (Porphyridium cruentum)*. Biodiversitas. 8(1) : 48-53.
- Laila, S.N. 2011. *Uji Efektivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Salam (Syzygium polyanthum) terhadap Streptococcus mutans Rongga Mulut secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Manan, M.H.A. 2008. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Muafidah, N. 2008. *Respon Pertumbuhan Stek Salam (Eugenia polyantha (Wight.) Walp.) Terhadap Lama Penyungkupan dan Pemberian Auksin*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mukhlisoh, W. 2010. *Pengaruh Ekstrak Tunggal dan Gabungan Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi Linn.) Terhadap Efektivitas Antibakteri Secara In Vitro*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Mulyatno, K.C. 2013. *Mekanisme Resistensi Bakteri pada Antibiotik*. (Online). ([http://www.itd.unair.ac.id/index.php?option=com\\_content&view=article&meكانيsme-resistensi-bakteri-pada-antibiotik.htm](http://www.itd.unair.ac.id/index.php?option=com_content&view=article&meكانيsme-resistensi-bakteri-pada-antibiotik.htm). diakses 12 januari 2013).
- Neviyanti. 2004. Biokompatibilitas Irigasi Saluran Akar
- Newman, M., Arie, V.W.K. 2001. *Antibiotic & Antimicrobial Use in Dental Practice 2<sup>nd</sup> ed*. USA: Quintessence Publishing Inc.

- Notobroto, B. Hari. 2005. *Penelitian Eksperimental Dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Perhitungan Besar Sampel Angkatan III*. Surabaya : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Nurhayati, D.M. 2010. *Konsentrasi Efektif Ekstrak Daun Salam dalam Menghambat Pertumbuhan Streptococcus Mutans pada Polyvinyl Siloxane*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Parwata, I.M.O.A., Dewi, P.F.S. 2008. *Isolasi dan Uji Antibakteri Minyak Atsiri dari Rimpang Lengkuas (Alpinia galanga L.)*. J. Kimia Vol. 2 No. 2. hal. 100-104.
- Purkayastha, S. 2012. *Evaluation of Antimicrobial and Phytochemical Screening of Fennel, Juniper and Kalonji Essential Oils against Multi Drug Resistant Clinical Isolates*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. p. 1625-1629.
- Qualtrough, A.J.E, J.D. Satterthwaite. 2005. *Principles of Operative Dentistry*. Oxford: Blackwell Publishing Co. p. 51-52.
- Reveny, J. 2011. *Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (Piper betle Linn.)*. Jurnal Ilmu Dasar Vol. 12 No. 1. hal. 6-12.
- Roberson, T.M. 2000. *Sturdevant's Operatove Dentistry 4<sup>th</sup> ed*. Philadelphia: Mosby.
- Samadi, K. 2002. *Preparasi Saluran Akar Bengkok dan Sempit dengan Teknik Balance Force*. Majalah Kedokteran Gigi Surabaya vol. 36. hal. 39-41.
- Samaranayake, L.P. 2002. *Essential Microbiology for Dentistry 2<sup>nd</sup> ed*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Sampurno. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan, Jakarta.
- Sanjaya, H. 2007. *Khasiat Antibakteri Bahan Irigasi Infusum Daun Sirih 20%, Sodium Hipoklorit 2,5%, dan Hidrogen Peroksida Terhadap Streptococcus Viridans*. Surabaya: FKG Universitas Airlangga. hal. 31-32.
- Schwan, W. 2007. *Streptococcus pyogenes*. (Online). ([http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/falk\\_pete/identification.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2007/falk_pete/identification.htm)). diakses 7 Oktober 2013).
- Sjahrurachman, A. 2006. *Resistensi Bakteri Terhadap Aminoglikosida*. Jakarta: Jurnal Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. p: 49.
- Stephens, S. 2006. Biological Diversity. *Streptococcus pyogenes*. (Online). (<http://legacy.earlham.edu/~stephse/Streptococcuspyogenes.htm>). diakses 7 Oktober 2013)

- Studiawan, H., Santosa, M.H. 2005. *Uji Aktivitas Penurun Kadar Glukosa Darah Ekstrak Daun Eugenia polyantha pada Mencit yang Diinduksi Aloksan*. Jurnal Media Kedokteran Hewan Vol. 21 No. 2. hal. 62-65.
- Sudarsono, P.N., Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus A., Purnomo. 2002. *Tumbuhan Obat II (Hasil Penelitian, Sifat-sifat, dan Penggunaan)*. Yogyakarta: Pusat Studi Obat Tradisional Universitas Gajah Mada.
- Sumono, A., Wulan A. 2009. *Kemampuan Air Rebusan Daun Salam (Eugenia polyantha W.) dalam Menurunkan Jumlah Koloni Bakteri Streptococcus sp.* Majalah Farmasi Indonesia. 20(3): 112-117.
- Tanu, I. 2007. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. hal. 585-587.
- Todar, K. 2008. *Streptococcus pyogenes and Streptococcal Disease*. (Online). (<http://www.textbookofbacteriology.net/streptococcus.html>). diakses 7 Oktober 2013).
- Topazian, R.G., Goldberg, M.H., Hupp, J.R. 2002. *Oral and Maxillofacial Infection 4<sup>th</sup> ed.* Philadelphia: W.B. Sanders. p. 33-34.
- Tronstad, L. 2003. *Clinical Endodontics 2<sup>nd</sup> ed.* New York: Thieme Stuttgart. p. 84-139.
- Vichayanrat, S., et al. 2004. *Helicobacter pylori and Streptococcus pyogenes in Dental Plaque of Children*. (Online). ([https://iadr.confex.com/iadr/sea05/techprogram/abstract\\_69638.htm](https://iadr.confex.com/iadr/sea05/techprogram/abstract_69638.htm)). diakses 7 Oktober 2013).
- Walton, R.E, Torabinejad, M. 2008. *Prinsip & Praktik Ilmu Endodonsia Edisi 3*. Jakarta: EGC.
- Whitworth, John M. 2002 *Rational Root Canal Treatment in Practice*. London: Quintessence Publishing Co.
- WHO. 2011. *Use Antibiotics Rationally*. Regional Office of South-East Asia. p. 1-4.
- Wijaya, H.D. 2011. *Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam (Syzygium polyanthum) Terhadap Shigella dysenteriae Isolat Labkesda Surabaya Secara In Vitro*. (Abstrak). Tugas Akhir. Tidak diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Yanti, N. 2000. *Biokompatibilitas Larutan Irigasi Saluran Akar*. Dentica Journal FKG USU. 5(1): 1-2.

