



**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN  
BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi*)  
SEBAGAI ANTIBAKTERI  
*Streptococcus pyogenes* (IN VITRO)**

**SKRIPSI**  
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN  
MEMPEROLEH GELAR SARJANA

**OLEH:**  
**KHANSA FADHILA MA'ALI**  
**NIM: 155070401111031**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
TAHUN 2018**



## PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa naskah skripsi ini merupakan karya saya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah skripsi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah skripsi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia skripsi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh SARJANA dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Malang, 27 November 2018

Yang membuat pernyataan,

Khansa Fadhila Ma'ali

NIM. 155070401111031

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, dengan segala pertolongan, kemudahan, kasih sayang, kekuatan, petunjuk, serta ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul “Uji Efektivitas Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Sebagai Antibakteri *Streptococcus pyogenes* (*In Vitro*). Skripsi ini diajukan untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar sarjana kedokteran gigi.

Dengan selesainya skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

1. drg. R. Setyohadi, M.S selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
2. drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp. KG selaku Kepala Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
3. Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK (K) sebagai pembimbing satu yang bersedia meluangkan waktu, membimbing, membagi ilmunya, memberikan masukan-masukan yang membangun, dan memberikan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi ini.
4. drg. Malianawati Fauzia, Sp. Perio sebagai pembimbing dua yang bersedia meluangkan waktu, membimbing, membagi ilmunya, memberikan masukan-masukan yang membangun, dan memberikan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi ini.

5. drg. Viranda Sutanti, M.Si selaku penguji yang juga memberikan masukan dan arahan dalam memperbaiki proposal skripsi ini.
6. Yang tercinta mama tercantik Sisdiana , papa terhebat Arif Ma'ali, dan adik terpintar Salma Zain Ma'ali yang selalu mendengarkan keluh kesah penulis dan menguatkan penulis serta doa yang tiada putusnya.
7. Yang tersayang Almarhumah eyang Rokhayah, semoga beliau bangga disana. Simbah Siti Muntofiah, budhe Sisdiati, dan pakde Jaja Zakarya yang selalu menjadi motivasi untuk penulis serta doa yang terus mengalir.
8. Sahabat dan teman-teman seperjuangan dalam meraih cita-cita yang selalu saling mengingatkan dan menguatkan.
9. Pihak-pihak dari lab Mikrobiologi yang banyak membantu khususnya Pak Slamet sebagai analis yang mendampingi penulis. Pak Ali dan Mbak Mega.
10. Semua pihak yang membantu selesainya skripsi ini, yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Semoga Allah SWT memberikan kebaikan yang lebih dari kebaikan-kebaikan yang telah mereka tanam. Semoga amalan mereka menjadi amal jariyah yang terus mengalir.

Penulis menyadari bahwa tentunya terdapat kekurangan dari proposal skripsi ini, oleh karena itu penulis sangat menerima saran serta kritik yang membangun.

Demikian, semoga karya ini bermanfaat dan atas perkataan yang tidak berkenan di hati pembaca, penulis memohon maaf dengan tulus.

## ABSTRAK

Ma'ali, Khansa Fadhila. 2018. *Uji Efektivitas Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi) Sebagai Antibakteri Streptococcus pyogenes (In Vitro)*. Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK (K). (2) drg. Malianawati Fauzia, Sp. Perio.

Penyakit pulpa termasuk ke dalam sepuluh besar penyakit rawat jalan dengan kunjungan terbanyak di Indonesia pada tahun 2010. Karies atau yang biasa kita ketahui dengan gigi berlubang dapat membuka jalan bakteri untuk menyebabkan infeksi saluran akar hingga ke jaringan periapikal. Salah satu bakteri yang ada dalam saluran akar dengan prevalensi tertinggi adalah *Streptococcus pyogenes*. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang kaya satu diantaranya adalah tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*). Daun belimbing wuluh mengandung zat yang memiliki aktifitas antibakteri antara lain flavonoid, saponin, dan tannin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun belimbing wuluh sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Penelitian ini termasuk dalam *true eksperimental* dengan desain *Post test only control group*. Ekstrak daun belimbing wuluh 12,5%, 25%, 37,5%, 50%, 100%, aquadest sebagai kontrol negatif, serta clorhexidine 0,2% sebagai kontrol positif diuji daya hambatnya menggunakan metode difusi sumuran. Konsentrasi 12,5% sudah menunjukkan respon kuat dengan zona hambat 12.38 mm dan terus meningkat pada konsentrasi yang lebih tinggi. Uji statistik menggunakan One Way Anova menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada seluruh zona hambat yang terbentuk dari masing-masing perlakuan. Uji Korelasi *Pearson* menunjukkan adanya hubungan positif antara konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dengan zona hambat yang terbentuk. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi zona hambat yang terbentuk. Kekuatan hubungan antara konsentrasi dengan zona hambat yang terbentuk termasuk sangat kuat berdasarkan interpretasi dari koefisien korelasi yang didapat yaitu 0,845. Dapat disimpulkan dari penelitian ini bahwa ekstrak daun belimbing wuluh efektif sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes*.

Kata kunci: ekstrak daun belimbing wuluh, antibakteri, zona hambat, *Streptococcus pyogenes*.



## ABSTRACT

Ma'ali, Khansa Fadhila. 2018. *The Effectivity Test of Starfruit Leaves Extract (Averrhoa bilimbi) as Antibacterial Against Streptococcus pyogenes using In Vitro Method*. Minor thesis. Dentistry Faculty of Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK (K). (2) drg. Malianawati Fauzia, Sp. Perio.

Pulp disease is one of the top ten outpatient diseases with the most visits in Indonesia in 2010. Caries or what we usually know with cavities can open the way for bacteria to cause root canal infections down to periapical tissue. One of the bacteria in the root canal with the highest prevalence is *Streptococcus pyogenes*. Indonesia has a rich biodiversity, one of them is the wuluh starfruit (*Averrhoa bilimbi*) plant. Wuluh starfruit leaves contain substances that have antibacterial activity including flavonoids, saponins, and tannins. This study aims to determine the effectiveness of extract of wuluh starfruit leaves as an antibacterial for *Streptococcus pyogenes in vitro*. This research belongs to true experimental with post test only control group design. Wuluh starfruit leaf extract 12.5%, 25%, 37.5%, 50%, 100%, aquadest as a negative control, and clorhexidine 0.2% as a positive control tested its inhibitory power using the well diffusion method. The concentration of 12.5% has shown a strong response with a 12.38 mm inhibition zone and continues to increase at higher concentrations. Statistical tests using One Way Anova showed significant differences in all inhibitory zones formed from each treatment. The Pearson Correlation Test showed a positive relationship between the concentration of extract of starfruit leaf extract and the formed zone of inhibition. The higher the concentration, the higher the inhibitory zone that is formed. The strength of the relationship between the concentration and the formed inhibitory zone is very strong based on the interpretation of the correlation coefficient obtained, which is 0.845. It can be concluded from this study that the extract of wuluh starfruit leaves is effective as an antibacterial for *Streptococcus pyogenes*.

Keywords: Wuluh starfruit leaves extract, antibacterial, inhibitory zone, *Streptococcus pyogenes*.

## DAFTAR ISI

<b>Halaman Judul .....</b>	<b>i</b>
<b>Halaman Pengesahan .....</b>	<b>ii</b>
<b>Pernyataan Orisinalitas Skripsi .....</b>	<b>iii</b>
<b>Kata Pengantar .....</b>	<b>iv</b>
<b>Abstrak .....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>viii</b>
<b>Daftar Isi .....</b>	<b>ix</b>
<b>Daftar Gambar .....</b>	<b>xii</b>
<b>Daftar Tabel .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Daftar Lampiran .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Daftar Singkatan .....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 Tanaman Belimbing Wuluh .....	6
2.1.1Klassifikasi dan Morfologi .....	6
2.1.2Daun Belimbing Wuluh sebagai Antibakteri.....	8
2.2 Metode Ekstraksi .....	9
2.3 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	11
2.3.1 Klassifikasi .....	12
2.3.2 Morfologi <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	13
2.3.3 <i>Streptococcus pyogenes</i> dan Infeksi Saluran Akar .....	13



2.3.4 Uji Identifikasi <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	15
2.4 Uji Daya Hambat.....	19
2.4.1 Metode Difusi Agar.....	19
2.4.2 Metode Dilusi.....	20

**BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS**

**PENELITIAN..... 21**

3.1 Kerangka Konsep.....	21
3.2 Hipotesis.....	22

**BAB IV METODE PENELITIAN..... 23**

4.1 Rancangan Penelitian.....	23
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	23
4.3 Estimasi Jumlah Pengulangan.....	23
4.4 Variabel Penelitian.....	24
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	24
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	25
4.6.1 Alat.....	25
4.6.2 Bahan.....	25
4.7 Definisi Operasional.....	26
4.8 Prosedur Penelitian.....	28
4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh.....	28
4.8.2 Identifikasi Bakteri.....	28
4.8.2.1 Prosedur Pewarnaan Gram.....	29
4.8.2.2 Prosedur Uji Katalase.....	30
4.8.2.3 Prosedur Uji Hemolisis.....	30
4.8.2.4 Prosedur Uji Bacitracin.....	30
4.8.3 Prosedur Pembuatan BHI-A.....	31



4.8.4	Prosedur Pengenceran Ekstrak Daun Belimbing Wuluh..	31
4.8.5	Prosedur Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Belimbing Wuluh.....	32
4.9	Alur Penelitian .....	33
4.10	Analisis Data.....	34
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....</b>		<b>35</b>
5.1	Hasil Penelitian .....	35
5.1.1	Hasil Identifikasi <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	35
5.1.2	Hasil Ekstraksi Daun Belimbing Wuluh .....	38
5.1.3	Hasil Penelitian Pendahuluan .....	38
5.1.4	Hasil Uji Daya Hambat .....	40
5.2	Analisis Data .....	42
<b>BAB VI PEMBAHASAN.....</b>		<b>47</b>
<b>BAB VII PENUTUP.....</b>		<b>52</b>
7.1	Kesimpulan.....	52
7.2	Saran.....	52
<b>Daftar Pustaka.....</b>		<b>53</b>
<b>Lampiran.....</b>		<b>60</b>



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Pohon dan daun belimbing wuluh .....	6
Gambar 2.2 <i>Streptococcus</i> pada media agar darah dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 x.....	13
Gambar 2.3 Tipe-tipe hemolisis diamati pada agar darah .....	18
Gambar 3.1 Kerangka konsep .....	21
Gambar 4.1 Alur penelitian .....	33
Gambar 5.1 Hasil uji pewarnaan gram .....	35
Gambar 5.2 Hasil uji katalase.....	36
Gambar 5.3 Hasil uji hemolisis .....	37
Gambar 5.4 Hasil uji bacitracin.....	37
Gambar 5.5 Hasil ekstraksi daun belimbing wuluh.....	38
Gambar 5.6 Hasil uji daya hambat menggunakan metode sumuran .....	40
Gambar 5.7 Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dengan zona hambat yang terbentuk .....	42



**DAFTAR TABEL**

Tabel 5.1 Hasil Penelitian Pendahuluan..... 39

Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Belimbing Wuluh sebagai Antibakteri Streptococcus pyogenes..... 41

Tabel 5.3 Hasil Uji Normalitas menggunakan Shapiro-Wilk..... 42

Tabel 5.4 Hasil Uji Homogenitas menggunakan Lavene Statistic ..... 43

Tabel 5.5 Hasil Uji Beda menggunakan One Way Anova ..... 43

Tabel 5.6 Hasil Uji Post Hoc..... 44

Tabel 5.7 Hasil Uji Korelasi Pearson ..... 45

Tabel 5.8 Hasil Uji Regresi ..... 45

Tabel 5.9 Tabel Interpretasi Koefisien Korelasi Regresi ..... 46



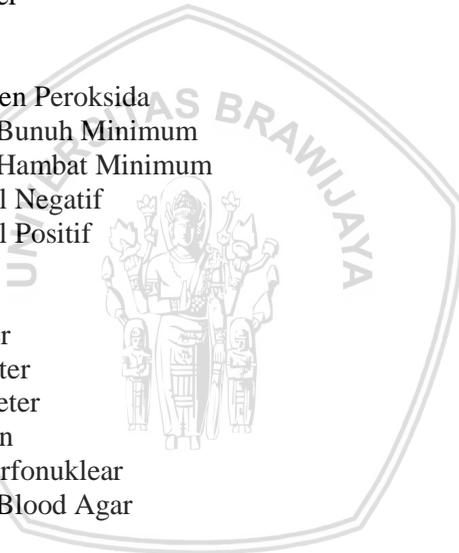
**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1 Alat dan Bahan Uji Identifikasi Bakteri..... 61  
 Lampiran 2 Proses Pembuatan Medium BHI-A..... 62  
 Lampiran 3 Proses Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Belimbing  
 Wuluh terhadap Pertumbuhan Streptococcus pyogenes..... 63  
 Lampiran 4 Analisis Data..... 64



## DAFTAR SINGKATAN

%	: persen
$\mu\text{m}$	: mikrometer
Anova	: <i>Analysis of Variance</i>
BHI-A	: <i>Brain Heart Infusion- Agar</i>
C	: celcius
CEJ	: <i>Cementoenamel Junction</i>
cm	: centimeter
CO <sub>2</sub>	: Karbon dioksida
d	: diameter
gr	: gram
H <sub>2</sub> O	: Air
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrogen Peroksida
KBM	: Kadar Bunuh Minimum
KHM	: Kadar Hambat Minimum
KN	: Kontrol Negatif
KP	: Kontrol Positif
lt	: liter
m	: meter
ml	: mililiter
mm	: milimeter
nm	: nanometer
O <sub>2</sub>	: Oksigen
PMN	: Polimorfonuklear
SBA	: Sheep Blood Agar
x	: kali
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\gamma$	: Gamma



## ABSTRAK

Ma'ali, Khansa Fadhila. 2018. *Uji Efektivitas Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi) Sebagai Antibakteri Streptococcus pyogenes (In Vitro)*. Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK (K). (2) drg. Malianawati Fauzia, Sp. Perio.

Penyakit pulpa termasuk ke dalam sepuluh besar penyakit rawat jalan dengan kunjungan terbanyak di Indonesia pada tahun 2010. Karies atau yang biasa kita ketahui dengan gigi berlubang dapat membuka jalan bakteri untuk menyebabkan infeksi saluran akar hingga ke jaringan periapikal. Salah satu bakteri yang ada dalam saluran akar dengan prevalensi tertinggi adalah *Streptococcus pyogenes*. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang kaya satu diantaranya adalah tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*). Daun belimbing wuluh mengandung zat yang memiliki aktifitas antibakteri antara lain flavonoid, saponin, dan tannin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun belimbing wuluh sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*. Penelitian ini termasuk dalam *true eksperimental* dengan desain *Post test only control group*. Ekstrak daun belimbing wuluh 12,5%, 25%, 37,5%, 50%, 100%, aquadest sebagai kontrol negatif, serta clorhexidine 0,2% sebagai kontrol positif diuji daya hambatnya menggunakan metode difusi sumuran. Konsentrasi 12,5% sudah menunjukkan respon kuat dengan zona hambat 12.38 mm dan terus meningkat pada konsentrasi yang lebih tinggi. Uji statistik menggunakan One Way Anova menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada seluruh zona hambat yang terbentuk dari masing-masing perlakuan. Uji Korelasi *Pearson* menunjukkan adanya hubungan positif antara konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dengan zona hambat yang terbentuk. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi zona hambat yang terbentuk. Kekuatan hubungan antara konsentrasi dengan zona hambat yang terbentuk termasuk sangat kuat berdasarkan interpretasi dari koefisien korelasi yang didapat yaitu 0,845. Dapat disimpulkan dari penelitian ini bahwa ekstrak daun belimbing wuluh efektif sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes*.

Kata kunci: ekstrak daun belimbing wuluh, antibakteri, zona hambat, *Streptococcus pyogenes*.



## ABSTRACT

Ma'ali, Khansa Fadhila. 2018. *The Effectivity Test of Starfruit Leaves Extract (Averrhoa bilimbi) as Antibacterial Against Streptococcus pyogenes using In Vitro Method*. Minor thesis. Dentistry Faculty of Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK (K). (2) drg. Malianawati Fauzia, Sp. Perio.

Pulp disease is one of the top ten outpatient diseases with the most visits in Indonesia in 2010. Caries or what we usually know with cavities can open the way for bacteria to cause root canal infections down to periapical tissue. One of the bacteria in the root canal with the highest prevalence is *Streptococcus pyogenes*. Indonesia has a rich biodiversity, one of them is the wuluh starfruit (*Averrhoa bilimbi*) plant. Wuluh starfruit leaves contain substances that have antibacterial activity including flavonoids, saponins, and tannins. This study aims to determine the effectiveness of extract of wuluh starfruit leaves as an antibacterial for *Streptococcus pyogenes in vitro*. This research belongs to true experimental with post test only control group design. Wuluh starfruit leaf extract 12.5%, 25%, 37.5%, 50%, 100%, aquadest as a negative control, and clorhexidine 0.2% as a positive control tested its inhibitory power using the well diffusion method. The concentration of 12.5% has shown a strong response with a 12.38 mm inhibition zone and continues to increase at higher concentrations. Statistical tests using One Way Anova showed significant differences in all inhibitory zones formed from each treatment. The Pearson Correlation Test showed a positive relationship between the concentration of extract of starfruit leaf extract and the formed zone of inhibition. The higher the concentration, the higher the inhibitory zone that is formed. The strength of the relationship between the concentration and the formed inhibitory zone is very strong based on the interpretation of the correlation coefficient obtained, which is 0.845. It can be concluded from this study that the extract of wuluh starfruit leaves is effective as an antibacterial for *Streptococcus pyogenes*.

Keywords: Wuluh starfruit leaves extract, antibacterial, inhibitory zone, *Streptococcus pyogenes*.

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Penyakit pulpa termasuk ke dalam sepuluh besar penyakit rawat jalan dengan kunjungan terbanyak di Indonesia pada tahun 2010 (Yamin dan Natsir, 2014). Karies membuka jalan bakteri untuk menyebabkan infeksi pulpa dan saluran akar hingga dapat menyebar ke jaringan periapikal (Ryska, 2007). Selain karies, terbukanya jalan menuju pulpa dapat disebabkan oleh trauma, fraktur, atrisi, abrasi, dan adanya celah pada CEJ (*Cementoenamel junction*) (Torabinejad and Walton, 2008).

Ketika pulpa terbuka, pulpa terinfiltrasi secara lokal oleh leukosit polimorfonuklear (PMN) untuk membentuk area nekrosis likuifaksi pada bagian yang terbuka. Bakteri berkoloni dan menetap pada area nekrosis tersebut. Jaringan pulpa dapat terus terinflamasi untuk waktu yang lama namun dapat juga mengalami nekrosis dalam waktu yang cepat (Torabinejad and Walton, 2008).

Infeksi saluran akar merupakan infeksi yang polimikrobial. Dalam penelitian yang dilakukan Al-Hamadani *Streptococcus pyogenes* merupakan salah satu bakteri yang memiliki presentase paling tinggi di dalam saluran akar yaitu 16.5% (Al-Hamadani, 2011).

Perawatan saluran akar merupakan tindakan yang dapat dilakukan untuk mempertahankan keberadaan gigi di dalam rongga mulut. Tujuan dari tindakan tersebut yaitu mengeliminasi bakteri dan mencegah terjadinya reinfeksi (Prasetya dan Abidin, 2016).

Perawatan saluran akar memiliki tiga tahap besar prosedur yang disebut juga triad endodontik, yaitu preparasi biomekanis, sterilisasi, dan pengisian. Dimana preparasi terdiri dari pembersihan dan pembentukan sedangkan sterilisasi terdiri dari irigasi dan desinfeksi (Bachtiar, 2016).

Irigasi merupakan tahap yang penting dimana jaringan nekrotik, serpihan dentin, serta mikroorganisme dikeluarkan dari saluran akar menggunakan larutan irigasi (Tanumiharja, 2010). Larutan irigasi yang paling sering digunakan adalah NaOCl namun larutan irigasi tersebut memiliki kelemahan, masuknya larutan tersebut ke dalam jaringan periapikal dapat menyebabkan cedera serius (American Association of Endodontist, 2011). Obat herbal dinilai lebih aman dan memiliki resiko kecil dibandingkan obat-obatan kimia (Anggarani dkk, 2012). Melihat keanekaragaman hayati yang dimiliki Indonesia, terdapat berbagai tanaman yang berpotensi sebagai larutan irigasi yang minim toksisitas.

Indonesia merupakan negara dengan keanekaragaman hayati terkaya kedua setelah Brazil dengan hutan amazonnya. Sekitar 80% tanaman herbal dunia ada di hutan tropis Indonesia (Faried *et al.*, 2015). Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) adalah satu dari sekian banyaknya tanaman herbal multiguna yang asli berasal dari Indonesia (Alhassan *and* Ahmed, 2016).

Dalam pengobatan tradisional, tanaman belimbing wuluh digunakan sebagai obat gatal hingga diabetes (Roy *et al.*, 2010). Telah diketahui dari beberapa penelitian bahwa tanaman belimbing wuluh memiliki aktifitas farmakologis antara lain antidiabetes,

antihipertensi, antitrombosis, hipolipidemik, hepatoprotektif, sitotoksik, antimikroba, penyembuhan luka, antelmintik, dan antioksidan (Alhassan *and* Ahmed, 2016).

Secara morfologi tanaman belimbing wuluh memiliki daun yang rimbun, daunnya terkluster pada ranting-ranting yang panjangnya 30 cm- 60 cm (Orwa *et al.*, 2009). Oleh karena itu pemanfaatannya perlu ditingkatkan.

Sebagai antimikroba, daun belimbing wuluh telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif *Bacillus careus* dan *Bacillus megateriu* serta, bakteri gram negatif *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Alhassan *and* Ahmed, 2016). Aktivitas tersebut terjadi karena daun belimbing wuluh memiliki kandungan Flavonoid, Saponin, dan Tanin yang merupakan antibakteri (Widhianto dkk., 2017) dengan Flavonoid sebagai kandungan terbanyak (Pendit, 2015). Melihat potensi antibakteri dari tanaman belimbing wuluh, perlu dilakukan penelitian mengenai uji efektivitas ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes* untuk mengetahui efektivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh terhadap bakteri tersebut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan “Apakah ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) efektif sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*?”

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1. Tujuan Umum

Mengetahui efektivitas ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes*.

#### 2. Tujuan Khusus

- (1) Mengetahui zona hambat ekstrak daun belimbing wuluh dalam berbagai konsentrasi terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.
- (2) Mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dengan zona hambat yang terbentuk.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1. Manfaat Akademis

- (1) Memberikan kontribusi pada perkembangan ilmu pengetahuan mengenai efektivitas ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes*.
- (2) Dapat digunakan sebagai referensi dan pertimbangan dalam melakukan penelitian lanjutan yang berkaitan dengan ekstrak daun belimbing wuluh maupun *Streptococcus pyogenes*.

#### 2. Manfaat Praktis

- (1) Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai pertimbangan bagi pelaku industri atau tenaga kesehatan dalam membuat produk larutan irigasi endodontik yang berbahan ekstrak daun belimbing wuluh.

- (2) Menambah wawasan masyarakat mengenai khasiat ekstrak daun belimbing wuluh sebagai antibakteri penyebab infeksi saluran akar.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Belimbing Wuluh

Tanaman blimbing wuluh yang memiliki nama latin *Averrhoa bilimbi* merupakan tanaman multiguna yang memiliki berbagai potensi pengobatan (Kumari, 2017). Tanaman herbal ini berasal dari Asia Tenggara tepatnya di Maluku, Indonesia dan Malaysia Barat. Namun tanaman ini telah dibudidayakan di negara-negara Asia Tenggara lainnya dan diluar Asia Tenggara seperti Perancis, Argentina, Australia, dan Brazil (Alhassan *and* Ahmed, 2016). Belimbing wuluh dikenal dengan nama yang berbeda di tiap negara antara lain belimbing asam (Malaysia), taling pling (Thailand), khe tau (Vietnam), calambolier bilimbi (Perancis), papino de indies (Argentina), dan Vinagrillo (Venezuela) (Ali *et al.*, 2013).

Tanaman belimbing wuluh secara tradisional digunakan untuk mengobati demam, penyakit gondok, jerawat, bisul, gatal-gatal, ulser aftosa, inflamasi rektum, batuk rejan, rematik, diabetes, dan hipertensi (Roy *et al.*, 2010).

Berdasarkan penelitian yang telah ada, tanaman belimbing wuluh diketahui memiliki aktifitas farmakologi yang luas antara lain sebagai antidiabetes, antihipertensi, antitrombosis, hipolipidemik, hepatoprotektif, sitotoksik, antimikroba, penyembuhan luka, antelmintik dan antioksidan (Alhassan *and* Ahmed, 2016).

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Kingdom : Plantae  
Subkingdom : Tracheobionta  
Superdivisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta  
 Kelas : Magnoliopsida  
 Sub-kelas : Rosidae  
 Ordo : Geraniales  
 Famili : Oxalidaceae  
 Genus : *Averrhoa*  
 Spesies : *Averrhoa bilimbi* (Ali *et al.*,2013)



**Gambar 2.1 A. Pohon Belimbing Wuluh, B. Daun Belimbing Wuluh (Ali *et al.*,2013).**

Tanaman belimbing wuluh merupakan tanaman berumur panjang yang tingginya bisa mencapai 5-10 m. Batangnya pendek namun memiliki cabang-cabang yang tumbuh tinggi. Daun-daunnya terkluster pada ranting yang memiliki panjang 30-60 cm. Daun belimbing wuluh memiliki panjang 2-10 cm dan lebar 1.2-1.25 cm. Daunnya memiliki bentuk membulat pada pangkal dan meruncing pada ujungnya. Warna daun belimbing wuluh yaitu hijau sedang pada sisi muka dan pucat pada sisi yang lainnya. Bunga belimbing wuluh memiliki ukuran yang kecil dengan warna hijau kekuningan dengan kombinasi ungu pada ujung kelima kelopaknya. Buahnya berbentuk elips, bewarna hijau tua ketika belum matang dan berubah menjadi hijau kakuningan ketika sudah matang. Buah belimbing

wuluh memiliki beberapa biji yang pipih dan berwarna coklat (Orwa *et al.*, 2009).

### **2.1.2 Daun Belimbing Wuluh Sebagai Antibakteri**

Dalam penelitian sebelumnya, ekstrak etanol daun belimbing wuluh telah terbukti memiliki aktifitas antibakteri yang cukup kuat pada enam mikroorganisme patogen yaitu *Bacillus cereus* dan *Bacillus megaterium* yang merupakan bakteri gram positif, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang merupakan bakteri gram negatif, serta *Aspergillus ochraceous* dan *Cryptococcus neoformans* yang merupakan jamur (Alhassan and Ahmed, 2016). Aktivitas tersebut disebabkan oleh kandungan antibakteri dari daun belimbing wuluh seperti flavonoid, tanin, dan saponin (Widhianto dkk., 2017).

#### **1. Flavonoid**

Flavonoid merupakan suatu kelompok senyawa polifenolik yang diklasifikasikan berdasarkan struktur molekulnya menjadi flavon, flavanon, katekin, dan antosianin. Flavonoid tersebar di seluruh kingdom plantae (Agrawal, 2011).

Flavonoid dikenal sebagai agen antibakteri terhadap berbagai macam organisme patogen (Xie *et al.*, 2015). Selain itu flavonoid memperlihatkan beberapa aktifitas biologis seperti antihepatotoksik, anti-inflamasi, antiviral, antialergi, dan antikanker (Agrawal, 2011).

Dalam perannya sebagai antibakteri, flavonoid bekerja dengan tiga mekanisme. Mekanisme pertama yaitu dengan menghambat sintesis asam nukleat, kedua yaitu penghambatan fungsi membran

sitoplasma, ketiga yaitu dengan penghambatan metabolisme energi (Xie *et al.*, 2015).

## 2. Tanin

Pada tumbuhan, tanin berperan dalam perlindungannya terhadap predator, serta pada regulasi pertumbuhan (Vanimakhal *and* Balasubramanian, 2016). Tanin merupakan senyawa polifenol yang memiliki berat molekul relatif tinggi. Tanin memiliki beberapa efek fisiologis pada tubuh seperti mempercepat pembekuan darah, menurunkan tekanan darah, menurunkan lemak, serta memodulasi respon imun (Ozcan *et al.*, 2014). Sebagai antibakteri, tanin bekerja dengan mendenaturasi protein serta menghambat metabolisme energi (Rohyani dkk, 2015).

## 3. Saponin

Saponin memiliki rasa pahit namun bermanfaat sebagai antitumor dan antikanker (Rohyani, 2015). Dalam perannya sebagai antibakteri, saponin menyebabkan kebocoran sel karena permeabilitas sel meningkat, sehingga organel intraseluler keluar (Ngajow dkk, 2013).

### 2.2 Metode Ekstraksi

Beberapa tumbuhan dan bagian-bagiannya dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antikarsinogenesis, antimikroba, anti-ulser, anti diabetes, dan anti-inflamasi. Hal itu karena tumbuhan mengandung zat kimia yang memiliki aktifitas biologis. Komponen bioaktif yang biasa disebut komponen fitokimia ini merupakan komponen non-nutritif yang bertanggung jawab melindungi tanaman dari serangan mikroba dan hama (Doughari, 2012).

Ekstraksi merupakan penarikan komponen bioaktif yang terdapat dalam sel tumbuhan menggunakan pelarut tertentu. Ekstraksi memisahkan komponen bioaktif yang terlarut dalam pelarut dan meninggalkan sel yang tidak terlarut dalam pelarut (Handa *et al.*, 2008).

Pemilihan pelarut akan menentukan keberhasilan ekstraksi. Untuk menarik senyawa yang bersifat polar maka dibutuhkan pelarut polar karena senyawa polar hanya akan larut dalam pelarut polar. Begitu pula untuk melakukan penarikan senyawa non polar harus menggunakan pelarut polar. Untuk mengekstraksi senyawa dengan berat molekul rendah seperti flavonoid dan saponin, alkohol atau campurannya dengan air merupakan pelarut yang ideal dan sering digunakan (Arifianti dkk, 2014).

### **1. Maserasi**

Metode maserasi pada dasarnya merupakan metode yang digunakan dalam pembuatan *wine*. Namun metode ini telah diadaptasi secara luas untuk penelitian tanaman herbal. Prosedur dalam metode ini adalah dengan merendam bahan kasar atau bubuk tanaman yang akan diekstrak dengan pelarut dalam wadah tertutup pada suhu ruang selama tiga hari dan dengan pengadukan yang sering. Hal ini dimaksudkan untuk melunakkan dan menghancurkan dinding sel sehingga melepaskan zat fitokimia terlarut. Setelah tiga hari kemudian larutan disaring menggunakan filter . Teknik ini merupakan teknik ekstraksi yang sederhana dan paling mudah (Azwanida, 2015).

## 2. Soxhlet

Metode *Soxhlet* memiliki kelebihan yaitu bahan yang akan diekstrak berkontak beberapa kali dengan pelarut murni yang sama sehingga tidak memerlukan pelarut dengan jumlah yang banyak. Dalam metode ini bahan yang akan diekstrak digiling halus dan ditempatkan dalam kantong berpori yang kuat lalu dimasukkan ke dalam *thimble*. Pelarut dipanaskan dalam labu kemudian menguap ke dalam bahan di dalam *thimble*, setelah itu mengembun di dalam kondensor dan menetes kembali. Larutan yang mengandung zat fitokimia akan menuju siphon arm dan cairan yang tidak mengandung zat fitokimia akan kembali ke labu (Azwanida, 2015).

## 3. Microwave Assisted Extractor (MAE)

MAE merupakan alat yang digunakan sebagai metode ekstraksi dengan memanfaatkan gelombang mikro (Purwanto dkk, 2010). Meskipun kebanyakan ekstraksi menggunakan bahan tanaman kering namun tanaman tetap mengandung sedikit kelembapan yang berperan sebagai target pemanasan microwave. Ketika dipanaskan, kelembapan yang ada menguap dan mengakibatkan tekanan yang tinggi pada dalam dinding sel, sehingga sel akhirnya pecah dan mengeluarkan zat aktif yang ada di dalam sel (Mandal *et al.*, 2007).

### 2.3 *Streptococcus pyogenes*

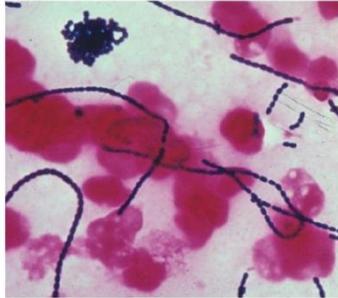
Nama *Streptococcus pyogenes* pertama kali diberikan oleh Friedrich Julius Rosenbach yang mempelajari bakteri yang diisolasi dari lesi supuratif pada tahun 1884. Sebelumnya Friedrich Fehleisen telah mengidentifikasi bakteri tersebut sebagai penyebab penyakit erysipelas pada tahun 1883 dan menamainya *Streptococcus*

*erysipelas* namun ternyata tidak ditemukan karakteristik tertentu yang membedakan kedua bakteri tersebut, begitu pula dengan bakteri penyebab demam puerperal dan demam scarlet yaitu *S. puerperalis* dan *S. scarlatinae*. Sehingga pada tahun 1932 Andrewes dan Christie menjadikan bakteri-bakteri tersebut ke dalam satu nama yaitu *Streptococcus pyogenes* (Ferreti *et al.*, 2016).

*Streptococcus pyogenes* merupakan flora normal dalam rongga mulut, selain itu juga biasa ditemukan pada faring, saluran pencernaan bawah, dan terkadang pada kulit (Kalpana *et al.*, 2014). Berbagai macam infeksi telah diketahui sebagai akibat dari *Streptococcus pyogenes* antara lain infeksi pernafasan, kutaneus, jaringan lunak, dan sistemik. Infeksi supuratif yang disebabkan oleh *Streptococcus pyogenes* antara lain Impetigo, Erysipelas, Carditis, Meningitis, Faringitis, demam Scarlet, Appendicitis, dan Vaginitis sedangkan infeksi non-supuratif antara lain demam rematik dan glomerulonefritis (Lamagni, 2008). *Streptococcus pyogenes* dapat menyebabkan infeksi sistemik melalui rongga mulut baik yang berasal dari saluran akar, poket periodontal, maupun mukosa yang terbuka (Inagaki *et al.*, 2017).

### 2.3.1 Klasifikasi

Kingdom	: Monera	
Domain	: Bacteria	
Divisio	: Firmicutes	
Class	: Bacili	
Order	: Lactobacilalles	
Family	: Streptococcaceae	
Genus	: <i>Streptococcus</i>	
Species	: <i>Streptococcus pyogenes</i>	(Ferreti <i>et al.</i> , 2016)



**Gambar 2.2 Streptococcus pada media agar darah dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x (Carrol *et al.*, 2015).**

### 2.3.2 Morfologi *Streptococcus pyogenes*

*Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri gram positif,  $\beta$  hemolisis, non-motil, dan tidak membentuk spora yang biasanya membentuk rantai atau berpasangan. Bentuk dari sel soliternya yaitu kokus bulat-ovoid dengan diameter 0,6-1,0  $\mu\text{m}$ . Sistem metabolismenya yaitu dengan cara fermentasi. Organisme ini merupakan katalase negatif dan anaerob fakultatif (Khas *et al.*, 2017). *Streptococcus pyogenes* tumbuh pada suhu 37 °C dalam udara ambien maupun dalam CO<sub>2</sub> 5-10% (Gera *and* McIver, 2013). Koloni dapat terlihat setelah 24 jam inkubasi dalam temperatur 35-37 °C (Spellerberg *and* Brandt, 2016).

### 2.3.3 *Streptococcus pyogenes* dan Infeksi Saluran Akar

Karies adalah penyakit bakterial kronis multifaktorial yang menyebabkan demineralisasi dan destruksi jaringan keras gigi karena asam hasil fermentasi dari debris makanan yang terakumulasi pada gigi oleh bakteri (Karpinski *and* Szkaradkiewicz, 2013). Faktor utama yang menyebabkan karies antara lain hospes (gigi dan saliva), substrat (sisa makanan), mikroorganisme penyebab karies, dan

waktu. Karies hanya akan terjadi apabila terdapat interaksi dari faktor-faktor tersebut. Infeksi saluran akar sebagian besar bermula dari karies, namun trauma atau retakan pada mahkota juga dapat menyebabkan terjadinya infeksi saluran akar (Mulyawati, 2011).

Infeksi saluran akar merupakan infeksi yang polimikrobal (Al-Hamadani, 2011). *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri yang memiliki presentase paling tinggi di dalam saluran akar yaitu 16.5% diikuti oleh *S.mutans* 15.6%, *S. sangius* 9.5% dan beberapa mikroba lain dalam presentase kecil seperti *Enterococcus faecalis* dan *Lactobacillus acidophilus* (Al-Hamadani, 2011).

Dalam keadaan normal pulpa dan dentin gigi bersifat steril dan terisolasi dari mikroorganisme oral karena terlindungi oleh enamel dan sementum. Namun ada beberapa keadaan yang menyebabkan perlindungan itu tertembus mungkin disebabkan oleh karies, trauma yang menyebabkan fraktur atau retak, prosedur restorasi, atrisi, atau abrasi. Akibatnya dentin dan pulpa terpapar oleh lingkungan di dalam mulut dan beresiko terinfeksi oleh mikroorganisme rongga mulut (Torabinejad and Walton, 2008).

Ketika pulpa terbuka jaringan pulpa terinfiltrasi secara local oleh leukosit polimorfonuklear (PMN) sehingga membentuk area nekrosis likuifaksi pada daerah yang terbuka. Setelah terbukanya pulpa, bakteri berkolonisasi dan menetap pada area nekrosis. Jaringan pulpa dapat mengalami inflamasi dalam waktu yang lama atau mengalami nekrosis dalam waktu yang cepat. Hal tersebut bergantung pada beberapa faktor antara lain virulensi bakteri, kemampuan untuk mengeluarkan cairan inflamasi untuk menghindari tekanan

intrapulpa, ketahanan host, jumlah sirkulasi, drainase limfe (Torabinejad *and* Walton, 2008).

### 2.3.4 Uji Identifikasi *Streptococcus pyogenes*

#### 1. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dikembangkan oleh Christian Gram pada tahun 1884. Kemudian hal tersebut menjadi dasar pembagian bakteri menjadi dua kelompok utama berdasarkan responnya terhadap prosedur pewarnaan Gram. Bakteri gram positif akan berwarna ungu, sedangkan gram negatif akan berwarna merah muda atau merah oleh teknik ini. Hal ini disebabkan oleh lapisan peptidoglikan yang lebih tebal pada bakteri gram positif membuat sel-sel lebih tahan terhadap tekanan osmotik daripada sel-sel bakteri gram negatif. Dinding sel bakteri gram positif terdiri dari 20-80 nm lapisan tebal peptidoglikan yang terletak diluar membran plasma sedangkan sel bakteri gram negatif memiliki 2-7 nm lapisan peptidoglikan yang dilapisi 7-8 nm membran luar tebal (Willey *et al.*, 2008).

Teknik pewarnaan Gram diawali dengan fiksasi bakteri dengan perlahan dilewatkan diatas api, tetesi dengan kristal violet selama 15 detik kemudian bersihkan kelebihannya, lalu tetesi dengan lugol selama 30 detik untuk mengikat warna, bersihkan kelebihannya, kemudian masuk pada step kritis yaitu melunturkan warna menggunakan aseton atau alkohol selama sekitar 5 detik, ketika sudah tidak ada lagi warna biru pada hapusan maka segera bilas menggunakan air, warnai lagi menggunakan carbolfuschin selama 30 detik atau *neutral red* selama 2 menit, bilas menggunakan air lalu keringkan (Samaranayake, 2012). Pada pewarnaan gram,

*Streptococcus pyogenes* akan menghasilkan warna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan gram positif (Gera and McIver, 2013).

## 2. Uji Katalase

Bakteri *Staphylococcus* memiliki morfologi yang menyerupai *Streptococcus*, namun *Staphylococcus* biasanya tersusun dalam kluster yang berbentuk seperti anggur dan keduanya dapat dibedakan menggunakan uji katalase. Semua bakteri *Staphylococcus* merupakan katalase positif sedangkan semua bakteri *Streptococcus* merupakan katalase negatif (Samaranayake, 2012). Selain untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Staphylococcus*, uji katalase juga digunakan untuk membedakan *Bacillus* dengan *Clostridium*. Yang mana *Bacillus* merupakan bakteri katalase positif dan *Clostridium* katalase negatif (Willey *et al.*, 2008).

Hidrogen peroksida dihasilkan oleh beberapa bakteri sebagai produk akhir oksidatif dari pemecahan gula secara aerob. Jika dibiarkan terakumulasi maka akan sangat beracun bagi bakteri dan dapat menyebabkan kematian (SMIs, 2014). Beberapa mikroorganisme memiliki enzim yang mampu melindungi diri dari produk  $O_2$  beracun termasuk hidrogen peroksida. Bakteri aerob obligat dan anaerob fakultatif biasanya mengandung enzim-enzim superoksida dismutase (SOD) dan katalase, yang masing-masing mengkatalisis pemecahan superoksida radikal dan hidrogen peroksida (Willey *et al.*, 2008).

Uji katalase digunakan untuk mendeteksi adanya enzim katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi oksigen dan air seperti reaksi berikut :



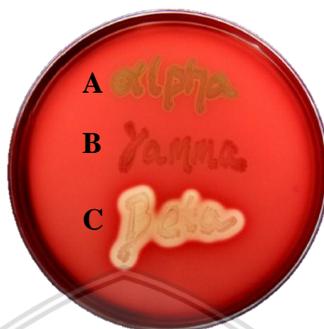
Ketika satu tetes larutan peroksida ditetaskan pada koloni bakteri yang menghasilkan katalase maka gelembung muncul ketika gas  $\text{O}_2$  terbentuk (Murray *et al.*, 2012).

Uji katalase dapat dilakukan dengan meneteskan 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  secara langsung pada biakan murni kemudian mengamati adanya gelembung. Hasil positif menunjukkan adanya gelembung sedangkan negatif menunjukkan tidak adanya gelembung yang terbentuk (SMIs, 2014).

### 3. Uji Hemolisis

Kemampuan koloni bakteri untuk melakukan perusakan sel darah merah atau yang biasa disebut hemolisis ketika ditumbuhkan pada media agar darah dapat digunakan untuk mengklasifikasikan mikroorganisme tertentu (Sharma *and* Gupta, 2014). Beberapa bakteri *Streptococcus* dapat menghemolisa sel darah merah dalam beberapa tingkat. Bakteri yang dapat menghemolisa eritrosit secara sempurna sehingga menghasilkan gambaran bening pada sekitar koloni termasuk ke dalam bakteri  $\beta$ - hemolisis. Lisis eritrosit yang tidak sempurna dengan pengurangan hemoglobin sehingga menghasilkan gambaran pigmen berwarna hijau di sekitar koloni termasuk dalam bakteri  $\alpha$ - hemolisis. Sedangkan bakteri *Streptococcus* lain yang tidak dapat melakukan hemolisis/non-

hemolitik masuk ke dalam golongan bakteri  $\gamma$ - hemolisis (Carrol *et al.*, 2015).



**Gambar 2.3 Tipe-tipe hemolisis diamati pada agar darah (Gera and McIver, 2013).**

**Keterangan: A. Hemolisis Alpha, B. Hemolisis Gamma, C. Hemolisis Beta.**

#### 4. Uji Bacitracin

*Streptococcus pyogenes* dapat dibedakan dengan bakteri streptococcus  $\beta$ -hemolisis lainnya dengan kesensitifannya terhadap bacitracin karena bakteri streptococcus  $\beta$ -hemolisis lainnya yang dapat memiliki antigen *Streptococcus pyogenes* resisten terhadap bacitracin. Cara melakukan uji ini adalah dengan menyiapkan cawan petri berisi SBA (Sheep Blood Agar), kemudian lakukan streaking kultur murni dari *Streptococcus pyogenes* pada agar tersebut. Setelah itu letakkan disk yang mengandung bacitracin 0,04 U pada agar yang telah distreak bakteri. Setelah inkubasi semalam pada suhu 35 °C dalam CO<sub>2</sub> 5% lakukan pengamatan, zona inhibisi yang terbentuk pada sekeliling disk mengindikasikan kepekaan dari bakteri *Streptococcus pyogenes* (Spellerberg and Brandt, 2016).

## 2.4 Uji Daya Hambat

### 2.4.1 Metode Difusi Agar

#### 1. Metode Kirby Bauer dan Joan-Stokes

Tujuan uji kerentanan difusi cakram Kirby-Bauer adalah untuk menentukan sensitivitas atau resistensi dari bakteri patogen aerobik dan bakteri anaerob fakultatif terhadap berbagai senyawa antimikroba sehingga membantu tenaga kesehatan untuk menentukan perawatan yang tepat untuk pasien (Hudzicki, 2009).

Organisme patogen ditanam pada media agar Mueller-Hinton dimana terdapat cakram-cakram yang telah diresapi bahan antimikroba. Ada dan tidaknya pertumbuhan di sekitar cakram adalah ukuran tidak langsung dari kemampuan bahan tersebut untuk menghambat organisme (Hudzicki, 2009).

Pada metode Kirby Bauer diameter area jernih dibandingkan dengan tabel standar CLSI (*Clinical Laboratory Standart Institute*). Akan diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet, atau resisten dari tabel tersebut (Noorhamdani dkk., 2016).

Prinsip uji sensitivitas Joan-Stokes sama dengan Kirby bauer namun tidak menggunakan pembandingan tabel standar. Isolat bakteri yang diuji dibandingkan dengan bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya. Prosedur dilakukan pada cawan yang sama secara bersamaan (Noorhamdani dkk., 2016).

#### 2. Metode Sumuran

Metode ini hampir sama dengan metode Kirby Bauer. Organisme patogen ditanam pada media agar Mueller-Hinton, kemudian dibuat lubang yang kemudian diisi dengan bahan antimikroba yang akan

diuji. Setelah diinkubasi dalam waktu tertentu pada suhu yang sesuai dengan bakteri uji, dilakukan pengamatan dengan memperhatikan ada dan tidaknya zona hambat yang terbentuk disekitar lubang (Prayoga, 2013).

#### **2.4.2 Metode Dilusi**

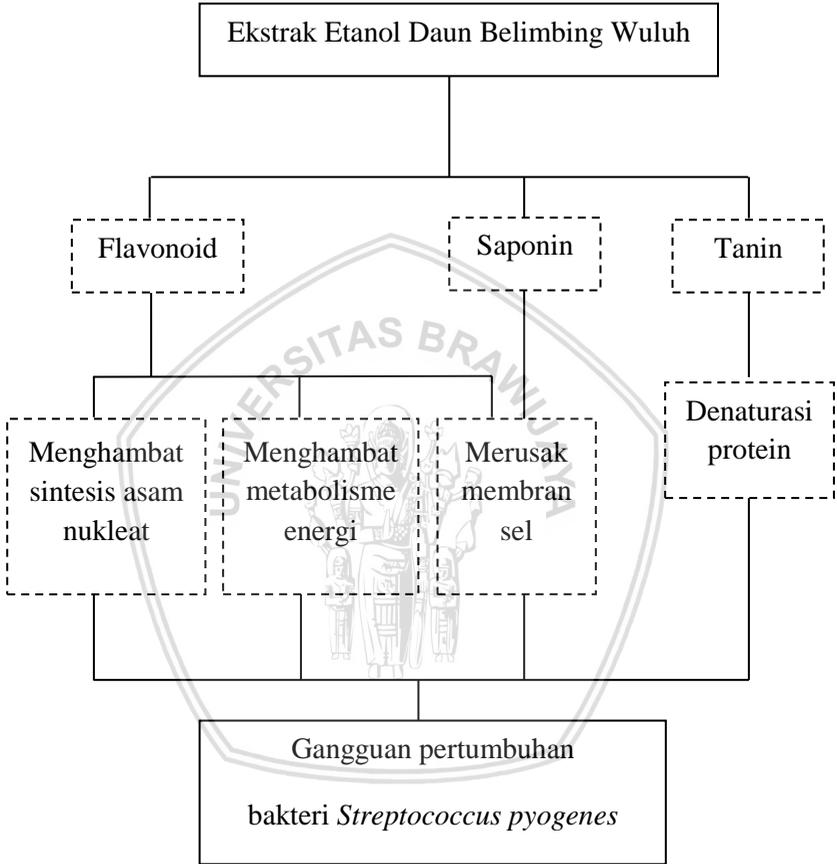
Metode dilusi dapat digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Pada metode ini satu seri tabung reaksi berisi antibiotik dengan konsentrasi antara 0.1-128  $\mu\text{g/ml}$  dipersiapkan dan dicampur dengan mikroorganisme yang diuji dalam jumlah standar (Willey *et al.*, 2008).

Konsentrasi antibiotik terendah yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba (ditandai dengan hasil biakan yang tampak jernih) setelah inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C, merupakan KHM dari antibiotik (Noorhamdani dkk., 2016).

KBM dapat dipastikan jika tabung-tabung yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroorganisme dikultur pada media padat tanpa antibiotik. Konsentrasi antibiotik terendah dimana mikroorganisme tidak kembali dan tumbuh ketika dipindah pada media padat merupakan KBM (Willey *et al.*, 2008).

### BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka konsep

Keterangan :



: Diteliti



: Tidak diteliti



Daun belimbing wuluh diekstrak menggunakan pelarut etanol 70%. Dari ekstraksi tersebut diperoleh zat-sat aktif yang memiliki aktivitas antibakteri. Zat-zat tersebut antara lain Flavonoid, Saponin, dan Tanin (Widhianto dkk., 2017).

Flavonoid memiliki tiga mekanisme yaitu menghambat pembentukan asam nukleat sehingga bakteri tidak dapat melakukan replikasi maupun sintesis enzim untuk kelangsungan hidupnya (Astuti, 2014), menghambat fungsi membran sitoplasma dengan meningkatkan kehilangan potasium sehingga menyebabkan kerusakan langsung pada membran sitoplasma, dan yang terakhir dengan menghambat metabolisme energi sehingga menghalangi suplai energi untuk bakteri (Xie *et al.*, 2015). Tanin bekerja sebagai antibakteri dengan mendenaturasi protein serta menghambat metabolisme energi (Rohyani dkk, 2015). Saponin menyebabkan rusaknya membran sel sehingga terjadi kebocoran sel (Ngajow dkk, 2013).

Dengan adanya zat-zat yang memiliki efek antibakteri dengan mekanismenya masing-masing yaitu flavonoid, tanin, dan saponin maka akan terjadi gangguan pada pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) efektif sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan jenis penelitian *true experimental* dengan desain *post test only control group*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi sumuran. Efektifitas ekstrak daun belimbing wuluh sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes* dapat diketahui dari hasil pengukuran diameter zona hambat masing-masing perlakuan. Selanjutnya dibandingkan dengan kelompok kontrol dan dilakukan observasi serta analisis.

### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini yaitu mikroorganisme penyebab infeksi saluran akar. Sampel penelitian ini yaitu *Streptococcus pyogenes* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.3 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah pengulangan penelitian yang diperlukan dihitung menggunakan rumus Federer:

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

Keterangan :

t : Jumlah kelompok perlakuan

n : Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan/ estimasi jumlah pengulangan

Dalam penelitian ini terdapat tujuh kelompok perlakuan yaitu dengan ekstrak daun belimbing wuluh 100%; 50%; 37,5%; 25%; 12,5%; kontrol negatif menggunakan aquadest steril, dan kontrol positif menggunakan clorhexidine. Maka jumlah pengulangan sampel untuk masing masing kelompok perlakuan yaitu:

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

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 15+6$$

$$n \geq 21 : 6$$

$$n \geq 3,5$$

Maka pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak empat kali pada masing-masing kelompok perlakuan.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 1. Variabel Bebas

Ekstrak daun belimbing wuluh 100%, 50%, 37,5%, 25%, 12,5%, aquadest steril (kontrol negatif), dan clorhexidine (kontrol positif).

##### 2. Variabel Terikat

Pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

#### 4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pada Juli 2018 dengan estimasi waktu satu bulan.

## 4.6 Alat Penelitian dan Bahan Penelitian

### 4.6.1 Alat

#### 1. Alat Pembuatan Ekstrak

Oven, blender, timbangan analitik, beaker glass, dan evaporator.

#### 2. Alat Untuk Pengenceran Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Mikropipet, microsentrifuge tube, dan vortex.

#### 3. Alat Pembuatan Media Agar

Labu erlenmeyer, gelas ukur, timbangan analitik, spatula, waterbath, autoklaf.

#### 4. Alat Untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Object glass, ose, spiritus burner, kertas hisap, mikroskop pembesaran objektif 100 x, dan tabung reaksi.

#### 5. Alat Untuk Uji Katalase

Object glass, pipet, dan ose.

#### 6. Alat Untuk Uji Bacitracin

Ose, pinset, dan inkubator.

#### 7. Alat Untuk Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Belimbing Wuluh terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*

Cawan petri, ose, borer, mikropipet, dan jangka sorong.

### 4.6.2 Bahan

#### 1. Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) dan Etanol 70%.

#### 2. Bahan Untuk Pengenceran Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Ekstrak daun belimbing wuluh dan aquadest.

#### 3. Bahan Pembuatan Media Agar

Bubuk BHI-A dan aquadest steril.

#### **4. Bahan Untuk Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram**

Isolat bakteri *Streptococcus pyogenes*, pewarnaan gram (kristal violet 90%, lugol, etyl alcohol 95%, safranin), dan aquadest.

#### **5. Bahan Untuk Uji Katalase**

Isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%.

#### **6. Bahan Untuk Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Belimbing Wuluh terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pyogenes***

Isolat bakteri *streptococcus pyogenes*, ekstrak daun belimbing wuluh, aquadest, clorhexidine, dan BHI-A.

### **4.7 Definisi Operasional**

#### **1. *Streptococcus pyogenes***

*Streptococcus pyogenes* strain Laboratorik yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

#### **2. Ekstrak Daun Belimbing Wuluh**

Ekstrak daun belimbing wuluh yang diproses di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

#### **3. Konsentrasi Ekstrak Daun Belimbing Wuluh**

Ekstrak daun belimbing wuluh yang diencerkan dan dinyatakan dalam persen volume persen volume-volume (% v/v).

#### **4. Kontrol Positif**

Kontrol positif merupakan perlakuan yang memiliki kemungkinan besar menghasilkan perubahan pada variabel terikat. Kontrol positif pada penelitian ini adalah obat antiseptik yaitu Clorhexidine.

## 5. Kontrol Negatif

Kontrol negatif merupakan kelompok kontrol tanpa perlakuan. Kontrol negatif pada penelitian ini adalah aquadest steril.

## 6. BHI-A

Brain Heart Infussion-Agar bubuk yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

## 7. Zona Hambat

Zona hambat merupakan diameter daerah yang tampak bening dan terbentuk pada medium pertumbuhan setelah dibuat lubang sumuran yang berisi ekstrak daun belimbing wuluh 100%; 50%; 25%, 37,5%; 12,5%; Clorhexidine, dan aquadest. Zona hambat yang terbentuk menunjukkan efektivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Klasifikasi daya hambat pertumbuhan yang dilihat dari pengukuran zona hambat terbagi menjadi empat kelompok antara lain respon lemah ( $\leq 5$  mm), sedang (5-10 mm), kuat (10-20 mm), dan sangat kuat ( $\geq 20$  mm) (Ngajow dkk., 2013). Cara pengukuran zona hambat yaitu menggunakan jangka sorong secara vertikal, horizontal, dan miring kemudian dirata-ratakan.

$$\text{Zona hambat} = \frac{\text{Vertikal} + \text{Horizontal} + \text{Miring}}{3}$$

## 4.8 Prosedur Penelitian

### 4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (Rosavina, 2014)

1. Mencuci sampai bersih daun belimbing wuluh yang akan diekstrak menggunakan air mengalir.
2. Mengiris daun belimbing wuluh yang telah dicuci secara tipis-tipis.
3. Mengeringkan irisan daun belimbing wuluh menggunakan oven dengan suhu 70°C.
4. Menghaluskan daun belimbing wuluh yang telah kering menggunakan blender sehingga menghasilkan simplisia daun belimbing wuluh.
5. Mengambil dan menimbang 200 gr simplisia daun belimbing wuluh.
6. Membungkus 200 gr simplisia daun belimbing wuluh dalam kertas saring kemudian memasukkannya ke dalam *beker glass* dengan ukuran 1 lt.
7. Memasukkan etanol 70% dengan perbandingan dengan ekstrak yaitu 4:1 yaitu 800 ml etanol ke dalam *beker glass* berisi simplisia yang telah dibungkus.
8. Merendam simplisia di dalam etanol selama 5-7 hari dengan pengadukan yang sering.

Melakukan evaporasi pada evaporator dengan suhu 60°C.

### 4.8.2 Identifikasi Bakteri

Uji untuk mengidentifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes* antara lain uji pewarnaan gram untuk memastikan bakteri tersebut

merupakan bakteri gram negatif atau positif, uji katalase untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Staphylococcus*, uji hemolisa untuk menentukan golongan *Streptococcus* berdasarkan kemampuannya menghemolisa darah, dan uji Bacitracin untuk membedakan *Streptococcus pyogenes* dengan bakteri *Streptococcus*  $\beta$ -hemolitik lainnya.

#### 4.8.2.1 Prosedur Pewarnaan Gram (Kautsaria, 2014)

1. Memberesihkan object glass dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api 6-12 kali untuk menghilangkan sisa lemak yang ada.
2. Mengambil aquadest steril menggunakan ose, teteskan pada object glass.
3. Memindahkan biakan bakteri dari media kultur ke permukaan object glass dan buat suspensi bakteri dengan aquadest, ratakan setipis mungkin.
4. Mengeringkan diudara kemudian lakukan fiksasi dengan melewati object glass diatas api 3-5 kali supaya melekat baik pada *object glass*.
5. Menetesi sediaan pada object glass dengan kristal violet selama 1 menit, buang sisa violet dan bilas dengan air.
6. Menetesi sediaan pada object glass dengan lugol selama 1 menit, buang sisa lugol dan bilas dengan air.
7. Menetesi sediaan pada object glass dengan alkohol 95% selama 5-10 detik, buang sisa alkohol dan bilas dengan air.
8. Menetesi sediaan pada object glass dengan safranin selama 1/2 menit, buang sisa safranin dan bilas dengan air.

9. Mengeringkan sediaan dengan kertas penghisap dan lihat dibawah mikroskop.
10. Hasil positif : *Streptococcus pyogenes* tercatat ungu (Gram Positif).

#### 4.8.2.2 Prosedur Uji Katalase (Dewi, 2013)

Tes katalase digunakan untuk membedakan *Streptococcus* (-) dengan *Staphylococcus* (+). Uji ini mendeteksi adanya katalase yang mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  (Willey *et al.*, 2008).

1. Meneteskan 1 tetes larutan  $H_2O_2$  3%.
2. Mengambil satu ose koloni bakteri dan letakkan diatas object glass lalu aduk rata.
3. Mengamati ada tidaknya gelembung, apabila terdapat gelembung artinya bakteri tersebut katalase positif. *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri katalase negatif sehingga tidak menghasilkan gelembung.

#### 4.8.2.3 Prosedur Uji Hemolisis (Tenggara, 2014)

1. Melakukan kultur bakteri *Streptococcus pyogenes* pada *blood* agar.
2. Mengamati adanya zona jernih di sekitar koloni yang menunjukkan bahwa bakteri *Streptococcus pyogenes* menghemolisa darah secara total atau bisa disebut  $\beta$ -hemolisis.

#### 4.8.2.4 Prosedur Uji Bacitracin (Spellerberg and Brandt, 2016)

1. Melakukan *streaking* bakteri kultur murni *Streptococcus pyogenes*.
2. Meletakkan disk Bacitracin pada agar yang telah diinokulasi bakteri menggunakan pinset steril.

3. Menginkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C dalam inkubator dengan kadar CO<sub>2</sub> 5%.
4. Mengamati zona hambat disekeliling disk. Adanya zona hambat yang terbentuk menunjukkan bahwa bakteri tersebut *Streptococcus pyogenes*.

#### **4.8.3 Prosedur Pembuatan BHI-A (Sulaiman dkk, 2017)**

1. Melarutkan 3,7 gram BHI-A ke dalam 100 ml aquadest di dalam labu erlenmeyer.
2. Memanaskan larutan hingga larut sempurna menggunakan waterbath.
3. Menyeterilkan larutan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, biarkan hingga suhu turun menjadi 40°C.
4. Menuangkan BHI-A ke dalam cawan petri.

#### **4.8.4 Prosedur Pengenceran Ekstrak Daun Belimbing wuluh (Kautsaria, 2014)**

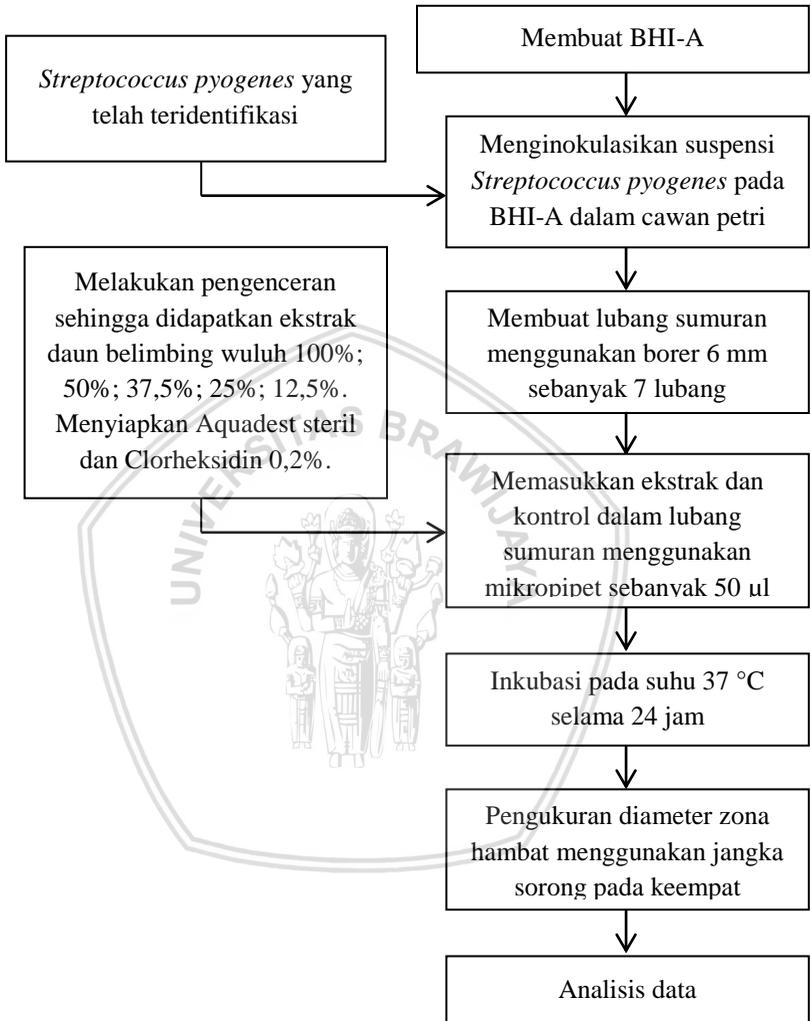
1. Ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 100% didapatkan dari mengambil 1 ml ekstrak daun belimbing wuluh 100%.
2. Ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 50% didapatkan dengan mencampur 0,5 ml ekstrak daun belimbing wuluh 100% dan 0,5 ml aquadest steril.
3. Ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 37,5% didapatkan dengan mencampur 0,375 ml ekstrak daun belimbing wuluh dan 0,635 aquadest steril.

4. Ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 25% didapatkan dengan mencampur 0,25 ml ekstrak daun belimbing wuluh dan 0,75 aquadest steril.
5. Ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 12,5% didapatkan dengan mencampur 0,125 ml ekstrak daun belimbing wuluh dan 0,875 aquadest steril.
6. Sebelum dimasukkan ke dalam sumuran, lakukan pengocokan menggunakan vortex.

#### **4.8.5 Prosedur Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Belimbing wuluh (Ambarwaty, 2014)**

1. Menyiapkan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*  $10^8$  CFU.
2. Mengnokulasikan bakteri pada media dengan cara memasukkan 1 ml suspensi bakteri pada cawan petri.
3. Memasukkan 20 ml media BHI-A yang masih cair ke dalam cawan petri yang sudah berisi suspensi bakteri.
4. Menutup cawan petri kemudian memutar-mutar cawan sehingga media dan suspensi bakteri tercampur rata.
5. Menunggu hingga media agar mengeras.
6. Melubangi media agar menggunakan borer kurang lebih 6mm. Buat tujuh lubang pada masing-masing cawan.
7. Mengisi lubang sumuran masing-masing sebanyak 50  $\mu$ l menggunakan mikropipet dengan masing-masing perlakuan.
8. Memasukkan cawan petri ke dalam inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 x 24 jam.
9. Mengukur zona hambat yang terbentuk pada sekeliling sumuran menggunakan jangka sorong dan dinyatakan dalam milimeter.

#### 4.9 Alur Penelitian



**Gambar 4.1 Alur Penelitian**

#### 4.10 Analisis Data

Jenis data yang digunakan merupakan data primer. Diambil dari hasil pengukuran zona hambat dari masing-masing perlakuan. Untuk mengetahui hubungan atau pengaruh perlakuan terhadap zona hambat yang terbentuk dilakukan uji Korelasi *Pearson*. Untuk melakukan uji Korelasi *Pearson* normalitas data harus terpenuhi, maka dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk*, apabila ternyata data tidak normal maka dilakukan uji Rank Spearman.

Untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari masing-masing perlakuan terhadap zona hambat dilakukan uji One Way Anova. Pada penelitian ini menggunakan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha : 0,05$ ). Untuk melakukan uji One Way Anova maka normalitas residual dan homogenitas harus terpenuhi. Maka dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk* dan homogenitas menggunakan *Levene Statistic*. Apabila normalitas dan homogenitas tidak terpenuhi maka dilakukan uji non parametrik menggunakan *Kruskal Wallis*.

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil Uji Identifikasi *Streptococcus pyogenes*

###### 1. Hasil Uji Pewarnaan Gram

Dalam penelitian ini digunakan bakteri *Streptococcus pyogenes* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Uji identifikasi dilakukan sebelum melakukan penelitian untuk memastikan bakteri yang akan digunakan benar *Streptococcus pyogenes*.



**Gambar 5.1 Hasil uji pewarnaan gram**

**Keterangan:** dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x tampak gambaran coccus berantai.

Dari hasil uji pewarnaan gram pada gambar 5.1 terlihat preparat berwarna ungu, yang menandakan bahwa bakteri tersebut merupakan gram positif. Terlihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 x gambaran bakteri berbentuk coccus yang agak lonjong dan membentuk rantai. Gambaran tersebut sesuai dengan morfologi *Streptococcus pyogenes*.

## 2. Hasil Uji Katalase

Bakteri *Streptococcus* dan *Staphylococcus* dapat dibedakan dengan uji katalase. Ketika ditetesi  $H_2O_2$  3% keduanya menunjukkan reaksi berbeda. Hasil uji katalase pada gambar 5.2 menunjukkan bahwa bakteri uji tidak menghasilkan gelembung. Hal tersebut membuktikan bahwa bakteri uji merupakan bakteri katalase negatif. Sedangkan bakteri pembanding yang diambil dari kultur murni *Staphylococcus* memperlihatkan terbentuknya gelembung.

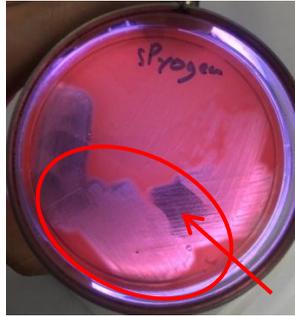


**Gambar 5.2 Hasil uji katalase**

**Keterangan:** A. *Streptococcus pyogenes* tidak menunjukkan adanya gelembung (Katalase negatif), B. Hasil uji katalase pada *Staphylococcus aureus* menunjukkan adanya gelembung (Katalase positif).

## 3. Hasil Uji Hemolisis

Hasil uji hemolisis pada gambar 5.3 memperlihatkan adanya gambaran jernih pada agar darah yang menunjukkan bahwa bakteri menghemolisis darah total. Hal tersebut sesuai dengan teori bahwa *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri *Streptococcus*-  $\beta$  hemolisis yaitu bakteri yang dapat menghemolisis darah total.



**Gambar 5.3 Uji hemolisis**

**Keterangan:** Tanda panah menunjukkan gambaran jernih akibat hemolisis darah total oleh *Streptococcus pyogenes*.

#### 4. Hasil Uji Bacitracin

Gambar 5.4 menunjukkan terbentuknya zona hambat pada sekeliling disk bacitracin sebesar 17 mm pada uji bacitracin. *Streptococcus pyogenes* dikatakan sensitif terhadap bacitracin apabila terbentuk zona hambat  $>15$  mm (Abraham and Sistla, 2016). Artinya dalam uji bacitracin yang telah dilakukan pada penelitian ini bakteri uji dikatakan sensitif terhadap bacitracin. Uji Bacitracin membuktikan bahwa bakteri uji merupakan *Streptococcus pyogenes* karena kesensitifitasan bakteri tersebut terhadap bacitracinlah yang membedakan *Streptococcus pyogenes* dengan bakteri *Streptococcus- $\beta$*  hemolisis lainnya.



**Gambar 5.4 Hasil uji bacitracin**

**Keterangan:** Tanda panah menunjukkan terbentuknya zona hambat sebesar 17mm.

Berdasarkan rangkaian uji identifikasi yang telah dilakukan. Dapat dipastikan bakteri yang akan digunakan untuk penelitian telah terbukti benar *Streptococcus pyogenes*.

### 5.1.2 Hasil Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Proses ekstraksi daun belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang. Sebanyak 200 gr simplisia daun belimbing wuluh yang didapat dari Materia Medica Batu diekstrak dengan pelarut etanol 70% sehingga menghasilkan ekstrak kurang lebih 50 ml. Ekstrak yang dihasilkan berupa cairan yang sedikit pekat dengan warna hijau tua.



**Gambar 5.5 Hasil ekstraksi daun belimbing wuluh**

**Keterangan:** Tanda panah menunjukkan cairan berwarna gelap sehingga tidak dapat dilakukan uji dilusi tabung.

### 5.1.3 Hasil Penelitian Pendahuluan

Sebelum penelitian dilakukan, untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan diperlukan penelitian pendahuluan. Dalam penelitian pendahuluan konsentrasi yang digunakan yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Clorhexidine 0,2% digunakan sebagai kontrol positif sedangkan aquades steril sebagai kontrol negatif.

**Tabel 5.1 Hasil Penelitian Pendahuluan.**

Perlakuan	d1	d2	d3	Rata-rata Diameter
KN	0	0	0	0
KP	23	23	22	22,6
100%	23	24	22	23
50%	19	19	18	18.66
25%	16	15	15	15.33
12.50%	12	13	12.5	12.5
6.25%	11	8,5	8	9.16

**Keterangan: KN: Kontrol Negatif, Aquades, KP: Kontrol Positif, Clorhexidine 0,2%.**

Dari penelitian pendahuluan didapatkan zona hambat pada semua konsentrasi. Kemudian dilakukan pengukuran zona hambat dan didapatkan angka sesuai yang tertulis pada tabel 5.1 . Pada perlakuan dengan konsentrasi ekstrak belimbing wuluh 100% didapatkan respon yang sangat kuat yaitu ditandai dengan ukuran zona hambat  $\geq 20$  mm. Pada konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% didapatkan respon kuat yang ditandai dengan ukuran zona hambat 10-20 mm. sedangkan pada konsentrasi 6,25% didapatkan respon yang sedang yaitu 5-10 mm (Ngajow dkk., 2013).

Berdasarkan uji pendahuluan kemudian dilakukan perapatan konsentrasi menjadi 100%, 50%, 37,5%, 25%, dan 12,5% sebagai konsentrasi final perlakuan dan masing-masing konsentrasi tersebut dilakukan replikasi sebanyak empat kali.

### 5.1.4 Hasil Uji Daya Hambat

Uji daya hambat dilakukan menggunakan metode difusi sumuran. Dari metode tersebut terlihat daerah bening di sekitar lubang sumuran yang merupakan zona hambat yang mempresentasikan kekuatan berbagai konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Konsentrasi yang digunakan yaitu 100%, 50%, 37,5%, 25%, 12,5%, clorhexidine 0,2% sebagai kontrol positif, dan aquadest sebagai kontrol negatif.



**Gambar 5.6 Hasil uji daya hambat menggunakan metode sumuran.**

**Keterangan gambar:**

- A** : hasil uji daya hambat pada replikasi I
- B** : hasil uji daya hambat pada replikasi II
- C** : hasil uji daya hambat pada replikasi III
- D** : hasil uji daya hambat pada replikasi IV
- 1** : ekstrak daun belimbing wuluh 100%
- 2** : ekstrak daun belimbing wuluh 50%
- 3** : ekstrak daun belimbing wuluh 37,5%
- 4** : ekstrak daun belimbing wuluh 25%
- 5** : ekstrak daun belimbing wuluh 12,5%
- 6** : aquadest steril sebagai Kontrol Negatif
- 7** : clorhexidine 0,2% sebagai Kontrol Positif

Hasil uji daya hambat menunjukkan adanya zona hambat dari seluruh konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh sehingga dapat dikatakan, ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 37,5%, 50%, dan 100% dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*. Hasil pengukuran zona hambat berbagai

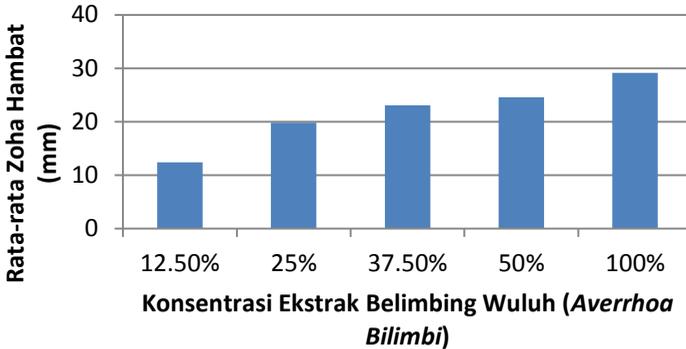
konsentrasi ekstrak belimbing wuluh menggunakan jangka sorong tercantum pada tabel 5.2 .

**Tabel 5.2 Hasil pengukuran uji daya hambat ekstrak daun belimbing wuluh sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes*.**

KONSENTRASI	ZONA HAMBAT EKSTRAK DAUN BELIMBING WULUH (mm)				RATA- RATA (mm)
	PENGULANGAN				
	I	II	III	IV	
KN	0	0	0	0	0
KP	22.96	23.13	23.1	23.6	23.20
100%	29.33	29.05	28.5	29.63	29.13
50%	24.1	25.23	23.83	25	24.54
37.5%	22.91	22.46	23.2	23.71	23.07
25%	19.23	20.03	20.26	19.61	19.78
12.5%	12.76	12.86	12	11.93	12.38

**Keterangan: KN: Kontrol Negatif, Aquadest, KP: Kontrol Positif, Clorhexidine 0,2%.**

Dari hasil pengukuran pada tabel di dapatkan rata-rata zona hambat terbesar yaitu pada kelompok perlakuan dengan ekstrak belimbing wuluh 100% dan rata-rata zona hambat terkecil pada kelompok perlakuan dengan ekstrak belimbing wuluh 12,5%. Perlakuan dengan ekstrak daun belimbing wuluh 12,5% dan 25% menunjukkan respon kuat (10-20 mm) sebagai antibakteri sedangkan pada konsentrasi 37,5%, 50%, dan 100% menunjukkan respon sangat kuat (>20 mm) sebagai antibakteri. Kontrol positif menunjukkan respon sangat kuat sebagai antibakteri. Ekstrak daun belimbing wuluh 37.5% menghasilkan zona hambat yang sama besar dengan kontrol positif sedangkan konsentrasi 50% dan 100% menghasilkan zona hambat yang lebih besar dari kontrol positif. Kontrol negatif yaitu aquades tidak menunjukkan adanya zona bening sehingga dapat dikatakan aquadest tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri.



**Gambar 5.7** Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dengan zona hambat yang terbentuk.

Dari hasil perhitungan rata-rata zona hambat didapatkan grafik yang terus naik. Kenaikan rata-rata zona hambat berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak belimbing wuluh maka rata-rata zona hambat yang dihasilkan semakin besar.

## 5.2 Analisis Data

### 5.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk menentukan apakah dalam penelitian ini menggunakan uji parametrik atau non parametrik. Uji *Shapiro-Wilk* digunakan karena jumlah sampel dalam penelitian ini kurang dari 50 (Razali *and* Wah, 2011).

**Tabel 5.3** Hasil uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*.

<i>Shapiro-Wilk</i>	Angka Signifikansi
Zona Hambat	0,349

Keterangan Tabel :  
 p=0,349 : distribusi normal (p>0,05)

Hasil uji normalitas menunjukkan angka signifikansi 0,349 yang artinya data dalam penelitian ini berdistribusi normal karena  $p > 0,05$  sehingga uji yang digunakan dalam analisis data penelitian ini adalah uji parametrik.

### 5.2.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan pada setiap uji parametrik. Uji ini digunakan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan berasal dari populasi yang sama.

**Tabel 5. 4 Hasil uji homogenitas menggunakan Lavene Statistic**

Levene Statistic	Angka Signifikansi
Zona Hambat	0.109

Keterangan Tabel :  
 $p=0,109$  : homogen ( $p > 0,05$ )

Uji homogenitas dilakukan menggunakan Levene Statistic. Angka signifikansi yang didapat dari uji tersebut adalah 0,109. Data dalam penelitian ini dapat dikatakan homogen karena  $p > 0,05$ .

### 5.2.3 Uji One Way Anova

Uji beda menggunakan One Way Anova dapat dilakukan karena telah memenuhi persyaratan antara lain data berdistribusi normal dan homogen (Usman dan Akbar, 2012). Uji ini digunakan untuk melihat adanya perbedaan zona hambat yang terbentuk antar perlakuan.

Adanya perbedaan dapat dibuktikan dengan angka signifikansi yang  $< 0,05$ .

**Tabel 5.5 Hasil Uji beda menggunakan One Way Anova.**

One Way Anova	Angka Signifikansi
Zona Hambat	0.000

Keterangan tabel :  
 $p=0,000$  : signifikan ( $p < 0,05$ )

Hasil perhitungan pada tabel 5.5 menunjukkan angka signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) sehingga dapat dinyatakan terdapat perbedaan signifikan zona hambat yang terbentuk pada seluruh perlakuan.

#### 5.2.4 Uji Post Hoc Tukey

Uji Post Hoc digunakan untuk melihat perbedaan antara dua perlakuan. Perbedaan ditandai dengan angka signifikansi ( $p < 0,05$ ).

**Tabel 5.6 Hasil uji Post Hoc.**

	KN	12,5%	25%	37,5%	50%	100%	KP
KN	-	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
12,5%	0,000	-	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25%	0,000	0,000	-	0,000	0,000	0,000	0,000
37,5%	0,000	0,000	0,000	-	0,003	0,000	1,000
50%	0,000	0,000	0,000	0,003	-	0,000	0,008
100%	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-	0,000
KP	0,000	0,000	0,000	1,000	0,008	0,000	-

**Keterangan:** KN: Kontrol Negatif, Aquadest, KP: Kontrol Positif, Clorhexidine 0,2%.

Dari tabel 5.6 dapat disimpulkan terdapat perbedaan signifikan pada seluruh antar perlakuan kecuali kontrol positif dengan konsentrasi 37% dan kontrol positif dengan konsentrasi 50%. Hal itu menandakan konsentrasi 37% dan 50% memiliki efek yang setara dengan kontrol positif yaitu obat antiseptik clorhexidine. Konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh terkecil yang memiliki daya antibakteri *Streptococcus pyogenes* setara dengan obat yaitu 37%.

#### 5.2.5 Uji Korelasi Pearson

Uji Korelasi dilakukan untuk melihat adanya hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat serta melihat arah hubungan tersebut. Untuk melihat hubungan antara kedua variabel yang berskala interval maka digunakan uji korelasi *Pearson* (Usman dan Akbar, 2012).

**Tabel 5.7 Hasil uji korelasi *Pearson*.**

	Konsentrasi	Zona Hambat
Konsentrasi	1	(+) 0,845
Zona Hambat	(+) 0,845	1

Keterangan tabel :

$r = (+) 0,845$  : korelasi bernilai positif

Hasil uji korelasi antara konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dengan zona hambat yang terbentuk menunjukkan angka 0,845. Angka menunjukkan nilai positif (+) yang artinya konsentrasi dengan zona hambat memiliki hubungan searah. Semakin tinggi konsentrasi, maka semakin besar pula zona hambat yang terbentuk. Artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh maka semakin kuat aktifitasnya sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes*.

### 5.2.6 Uji Regresi

Uji regresi menunjukkan seberapa besar pengaruh konsentrasi terhadap zona hambat yang terbentuk.

**Tabel 5.8 Hasil uji regresi.**

Uji Regresi	Nilai R
Konsentrasi dan Zona Hambat	0.845

Keterangan Tabel :

$R = 0,845$  : kekuatan hubungan sangat kuat

Hasil uji regresi menunjukkan angka 0.845. Kekuatan hubungan konsentrasi dengan zona hambat yang terbentuk sangat kuat berdasarkan interpretasi koefisien korelasi sebagaimana pada tabel 5.9 (Ndruru dkk., 2014).

**5.9 Tabel interpretasi koefisien korelasi**

Nilai koefisien korelasi	Interpretasi
0,00-0,199	Sangat rendah
0,20-0,399	Rendah
0,40-0,599	Sedang
0,60-0,799	Kuat
0,80-1,000	Sangat kuat



## BAB VI PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil uji identifikasi bakteri didapatkan bahwa bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya benar *Streptococcus pyogenes*. Uji identifikasi yang dilakukan antara lain pewarnaan gram, uji katalase, uji hemolisis, dan uji bacitracin.

Uji pertama yang dilakukan yaitu uji pewarnaan gram, hasil menunjukkan bahwa bakteri uji merupakan gram positif. Bakteri gram positif dapat mempertahankan pewarna primer yaitu kristal violet hingga akhir, sedangkan bakteri gram negatif akan melepaskan warna dari kristal violet ketika dibilas menggunakan zat pemucat yaitu alkohol (Sardiani dkk., 2015). Hal itu disebabkan oleh lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri gram positif lebih tebal daripada bakteri gram negatif dan kandungan lemak pada gram negatif lebih tinggi daripada bakteri gram positif (Safrida dkk., 2012). Alkohol sebagai pemucat bekerja dengan melarutkan lapisan lemak pada membran sel bakteri gram negatif dan membuat lapisan peptidoglikannya yang tipis menjadi bocor sehingga warna kristal violet keluar dari sel dan digantikan oleh safranin (Spear, 2018).

Uji katalase menunjukkan bahwa bakteri uji merupakan bakteri katalase negatif. Tidak terbentuknya gelembung menandakan bahwa tidak ada  $O_2$  yang terbentuk dari pemecahan hidrogen peroksida. Artinya bakteri *Streptococcus pyogenes* tidak memproduksi enzim katalase yang dapat memecah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  (Murray et al., 2012).

Uji hemolisis menunjukkan kemampuan *Streptococcus pyogenes* dalam menghemolisis darah secara total. Kemampuan tersebut didapat dari eksotoksin yang dikeluarkannya yaitu enzim streptolysin. Streptolysin dapat menyebabkan lisis sel darah merah. Terdapat dua jenis streptolysin yang dihasilkan yaitu streptolysin-O yang biasa menghasilkan gambaran  $\beta$  hemolisis di bawah permukaan agar dan streptolysin-S yang biasa menghasilkan gambaran  $\beta$  hemolisis pada permukaan agar (Sharma *and* Gupta, 2014).

Hasil uji bacitracin menunjukkan bahwa bakteri uji sensitif terhadap bacitracin. Kesensitifitasan tersebut yang membedakan *Streptococcus pyogenes* dengan bakteri  $\beta$  hemolisis lainnya. Bakteri  $\beta$  hemolisis lainnya tidak sensitif terhadap bacitracin karena memiliki antigen grup A yang resisten terhadap bacitracin (Spellerberg *and* Brandt, 2016).

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang telah dilakukan, ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilibi*) efektif sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes*. Konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh 12,5% ; 25% ; 37,5% ; 50% ; dan 100% seluruhnya menunjukkan adanya aktifitas antibakteri. Hal itu ditandai dengan terbentuknya zona hambat pada sekeliling sumuran medium BHI-A. Masing-masing memiliki ukuran yang berbeda-beda karena semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh maka zona hambat yang terbentuk semakin besar. Hal tersebut dapat terjadi karena dalam konsentrasi yang lebih tinggi, zat aktif yang terkandung di dalamnya juga lebih tinggi sehingga aktifitas antibakteri yang ditunjukkan semakin besar (Nurjanah, 2018).

Aktifitas ekstrak belimbing wuluh sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes* disebabkan oleh adanya zat aktif antara lain flavonoid, saponin, dan tanin dengan mekanismenya masing-masing. Flavonoid dalam aktifitasnya menghambat sintesis asam nukleat menyebabkan bakteri tidak dapat bereplikasi maupun menyintesis enzim untuk kelangsungan hidupnya (Astuti, 2014). Bakteri memerlukan energi untuk penyerapan aktif berbagai metabolit dan sintesis makromolekul. Flavonoid juga berperan dalam penghambatan pembentukan energi, sehingga menyebabkan kematian bakteri (Cushnie, 2005). Saponin merusak membran sel dengan menurunkan tegangan permukaan dinding sel sehingga permeabilitasnya terganggu. Cairan sitoplasma keluar dari sel dan menyebabkan kematian sel (Rijayanti, 2014). Tanin yang merupakan turunan dari fenol memiliki sifat lipofilik (Susanto, 2014). Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dengan protein menyebabkan rusaknya struktur protein, sehingga menyebabkan lisis (Rijayanti, 2014).

Uji aktifitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh telah dilakukan terhadap bakteri yang berbeda. Penelitian terhadap bakteri basil gram negatif yaitu *Eschericia coli* menunjukkan zona hambat 5-10 mm yang diinterpretasikan sebagai respon sedang. Tampaknya bakteri *Streptococcus pyogenes* lebih sensitif terhadap ekstrak daun belimbing wuluh daripada *Eschericia coli*. Dinding sel bakteri gram negatif memiliki susunan yang lebih kompleks sehingga kurang sensitif (Wasitaningrum, 2009). Dinding sel bakteri negatif terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tipis namun dilindungi oleh

membran luar yang terdiri dari lemak, lipoprotein, dan lipopolisakarida (Willey *et al.*, 2008).

Penelitian terdahulu mengenai antibakteri *Streptococcus pyogenes* menggunakan herbal lainnya juga telah dilakukan salah satunya menggunakan ekstrak etanol kelopak rosella (*Hibiscus Sabdariffa L.*). Pada penelitian aktivitas antimikroba ekstrak etanol kelopak rosella terhadap *Streptococcus pyogenes* didapatkan rata-rata zona hambat terbesar 33,03 mm yaitu pada konsentrasi 100% (Hasanah, 2016). Tampaknya ekstrak etanol kelopak rosella memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* yang lebih baik dari ekstrak daun belimbing wuluh. Kelopak rosella memiliki kadar flavonoid yang tidak jauh berbeda dengan daun belimbing wuluh. Kadar flavonoid kelopak rosella yaitu 12,76% sedangkan daun belimbing wuluh 14,5% (Pendit, 2015). Zat aktif antibakteri yang telah diketahui terkandung dalam kelopak rosella lebih beragam dari daun belimbing wuluh. Selain mengandung flavonoid, saponin, dan tanin ekstrak kelopak rosella memiliki kandungan alkaloid, anthosianin, dan fenol. Namun berbeda dengan daun belimbing wuluh yang zat aktifnya didominasi oleh flavonoid, daun rosella didominasi oleh anthosianin yaitu sebesar 60,26% (Pacome *et al.*, 2014).

Bagian lain dari tanaman belimbing wuluh yang telah diteliti sebagai antibakteri yaitu buah belimbing wuluh. Belum ada penelitian yang menguji aktifitas antibakteri ekstrak buah belimbing wuluh terhadap *Streptococcus pyogenes* namun ekstrak belimbing wuluh telah diuji terhadap bakteri coccus lainnya yaitu

*Staphylococcus aureus*. Uji aktifitas antibakteri ekstrak buah belimbing wuluh + DMSO terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode sumuran menunjukkan rata-rata zona hambat sebesar 24,37 mm pada konsentrasi 50% (Chandra, 2017). Aktifitas antibakteri daun belimbing wuluh 50% terhadap *Streptococcus pyogenes* menghasilkan zona hambat 24,54 mm yang tampaknya tidak jauh berbeda dari ekstrak buah belimbing wuluh 50% dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Uji fitokimia buah belimbing wuluh menunjukkan bahwa buah belimbing wuluh juga mengandung flavonoid dan saponin namun tidak mengandung tanin. Selain flavonoid dan saponin, buah belimbing wuluh memiliki zat aktif antibakteri yang tidak dimiliki daun belimbing wuluh yaitu coumarin dan fenol (Abraham, 2016).

Kandungan fitokimia tumbuhan satu dengan yang lainnya dapat berbeda karena dipengaruhi beberapa faktor. Faktor-faktor tersebut antara lain asal tanaman dan kondisi daerah penanaman, waktu panen, umur tanaman saat dipanen, pelarut yang digunakan saat ekstraksi, dan metode ekstraksi (Lumowa dan Bardin, 2018). Sehingga dalam pengembangan suatu herbal menjadi fitofarmaka atau produk lainnya diperlukan standarisasi sehingga dapat menjaga konsistensi kualitas herbal tersebut (Salim dkk, 2016).

## BAB VII PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian dan analisis data yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan beberapa hal berikut:

1. Ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) efektif sebagai antibakteri *Streptococcus pyogenes*.
2. Konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh dan zona hambat yang terbentuk memiliki hubungan yang searah sehingga semakin tinggi konsentrasi semakin besar zona hambat yang terbentuk

### 7.2 Saran

1. Penelitian secara *in vivo* perlu dilakukan untuk mengetahui aktifitas farmakologi dan toksikologi ekstrak daun belimbing wuluh sehingga dapat dikembangkan menjadi obat fitofarmaka yang berguna terutama sebagai bahan irigasi dalam perawatan saluran akar.
2. Penelitian mengenai aktifitas antibakteri bagian lain dari tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap *Streptococcus pyogenes* perlu dilakukan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham C.M. 2016. A Study on Phytochemical Constituents of *Averrhoa bilimbi* Linn. Fruits. *Indian Journal of Applied Research*, 6 (7): 29-31.
- Abraham T. and Sistla S. 2016. Identification of *Streptococcus pyogenes* – Phenotypic Tests vs Molecular Assay (*spy1258PCR*): A Comparative Study. *Journal of Clinical and Diagnostik Research*, 10(7): 1-3.
- Agrawal A.D. 2011. Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Science and Nanotechnology*, 4(2): 1394-1398.
- Al-Hamadani A. H., Al-Yasiri R.K., Manky M. A., and Al-Jannat M. A. 2011. Evaluation of The Antimicrobial Effect of Endodontic Sealers on Microbiota Associated with Root Canal Infections. *Qadisiyah Medical Journal*, 7(12): 1-12.
- Alhassan A.M. and Ahmed Q. U. 2016. *Averrhoa bilimbi* Linn.: A review of its ethnomedicinal uses, phytochemistry, and pharmacology. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 8(4): 265-271.
- Ali R.M., Hasanuzzaman M., and Hossain M. 2013. *Aspect of Averrhoa bilimbi: Life-Saving Role as Thrombolytic*, Lambert Academic Publishing, Saarbrucken. p. 19-30.
- Ambarwaty W. 2014. *Uji Daya Antibakteri Jus Bawang Merah (Allium ascaloni-cum.L) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus mutans Atcc 25175 Secara In Vitro*. Skripsi.
- American Association of Endodontist. 2011. Root Canal Irrigants and Desinfectants. *Endodontics: Colleagues for Excellence*, hal 1-7.
- Anggarani D.N., Kartika D., Novitasari D.A., Nasution M.N.A., Arindita N.D., dan Rahfiludin M.Z. 2012. “Table Kroasia” Tablet Krokot Berkhasiat, Inovasi Effervescent Dari Tanaman Krokot (*Portulacaoleracea L*) Sebagai Alternatif Minuman Bersuplemen Bagi Penderita Radang Usus Buntu. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa*, 2 (2): 91-96.

- Arifianti L., Oktarina R.D., dan Kusumawati I. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon stamineus Benth.* *E-Journal Planta Husada*, 2(1): 1-4.
- Astuti A. W. D. 2014. *Perbedaan Daya Antibakteri Antara Ekstrak Teh Hijau dan Teh Hitam*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Azwanida N.N. 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*, 4(3): 1-6.
- Bachtiar Z. A. 2016. Perawatan Saluran Akar pada Gigi Permanen Anak dengan Bahan Gutta Percha. *Jurnal PDGI*, 65(2): 60-67.
- Carrol K.C., Butel J.S., Morse S.A., and Mietzner T. 2015. *Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology*, 27<sup>th</sup> Ed., Mc Graw Hill Education, United States. p. 213.
- Chandra R. A. 2017. *Daya Antibakteri Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi Linn) terhadap Pertumbuhan Bakteri Methicillin Resistant Staphylococcus aureus secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Cushnie T. P. T and Lamb A. J. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, (26): 343-356.
- Dewi A.K. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veterine*, 31 (2): 138-150.
- Doughari J.H. 2012. Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, p 1-31.
- Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Mu-hamadyah Surakarta, Surakarta.

- Faried A., Bolly H.M.B., Septiani L., Kurnia D., Arifin M.Z., and Wirakusumah F.F. 2016. Potential of Indonesian Herbal Medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, for Targeting Multiple Malignancy Signaling Pathways: An Introductory Overview. *European Journal of Medicinal Plant*, 11(2): 1-17.
- Ferretti J., Kohler W., and Habil. 2016. History of Streptococcal Research. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*, p. 1-20.
- Gera K. and McLver K.S. 2013. Laboratory Growth and Maintenance of *Streptococcus pyogenes* (The Group A Streptococcus, GAS). *Current Protocol Microbiol*, 2(30): 1-14.
- Handa S.S., Khanuja S.P.S., Longo G., and Rakesh D.D. 2008. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, p. 21-54.
- Hasanah P.D. 2016. *Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Kelopak Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) terhadap Streptococcus pyogenes secara In Vitro dengan Metode Difusi Sumuran*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Hudzicki J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology*, p. 1-23.
- Inagaki Y., Abe M., Inaki R., Zong L., Suenaga H., Abe T., and Hoshi K. 2017. A Case of Systemic Infection Caused by *Streptococcus pyogenes* Oral Infection in an Edentulous Patient. *Diseases*, 5(3): 17-24.
- Kalpna D., Im C., and Lee Y.S. 2015. Comparative Growth, Cross Stress Resistance, Transcriptomics of *Streptococcus Pyogenes* Cultured Under Low Shear Modeled Microgravity and Normal Gravity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23: 24-33.
- Karpiński T. M. and Szkaradkiewicz A. K. 2013. Microbiology of dental caries. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(1): M21-M24.
- Kautsaria A. 2014. *Perbandingan Efek Antibakteri Ekstrak Daun Jambu Putih (Psidium Guajava L.) dengan Ekstrak Daun*

*Jambu Merah (Psidium Guajava L.) Terhadap Streptococcus mutans Secara In Vitro.* Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Khas L.A., Noorbakhsh S., Movahedi Z., and Ashouri S. 2017. *Streptococcus pyogene* and its Immunological Disorders in an Endemic Era: A Review Article in Iran. *Current Pediatrics*, 21(3): 445-451.

Kumari S.C. 2017. Studies on Bilimbi. *International Journal of All Research Education and Scientific Methods*, 5(7): 63-67.

Lumowa S. dan Bardin S. 2018. Uji Fitokimia Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.) Bahan Alam Sebagai Pestisida Nabati Berpotensi Menekan Serangan Serangga Hama Tanaman Umur Pendek. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1(9): 465-468.

Mandal V., Mohan Y., and Hemalatha S. 2007. PHCOG REV.: Review Article Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1): 7-18.

Mulyawati E. 2011. Peran Bahan Desinfeksi pada Perawatan Saluran Akar. *Majalah Kedokteran Gigi*, 18(2): 205-209.

Murray P. R., Rosenthal K.S., Pfaller M. A. 2012. *Medical Microbiology*, 7<sup>th</sup> Ed., Elsevier, Philadelphia. p. 174.

Ndruru R. E., Situmorang M., dan Tarigan G. 2014. Analisa Faktor-faktor yang Mempengaruhi Hasil Produksi Padai di Deli Serdang. *Saintia Matematika* 2(1): 71-83.

Ngajow M., Abidjulu J., dan Kamu V.S. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*. *Jurnal MIPA Unstrat Online*, 2(2): 128-132.

Noorhamdani, Sumarno, Roesektiningsih, Santosaningsih D., Mulyastuti Y., Rahayu S.I., dkk. 2016. *Bakteriologi Medik*, Edisi kedua, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Malang. hal. 38, 108.

Nurjanah S., Isbiyantoro, dan Fadhillah H. 2018. Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray)

- Sebagai Antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sanguinis*. *Jurnal Farmasi Lampung*, 7 (1): 1-8.
- Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., and Anthony S. 2009. Agroforestry Database: A Tree Reference and Selection Guide Version. (online), (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>), diakses 11 September 2018.
- Ozcan T., Bayazit A.A., Ersan L.Y., and Delikanli B. 2014. Phenolics in Human Health. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5): 393-396.
- Pacome O. A., Bernard D.N., Sekou D., Joseph D.A., David N.J., Mongomake K., et al. 2014. Phytochemical and Antioxidant Activity of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Petal Extract. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological, and Chemical Sciences*, 5 (2): 1453-1465.
- Pendit P. A. C. D. 2015. *Karakteristik Fisik-Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) (Kajian Jenis Pelarut dan Rasio Bahan-Pelarut)*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.
- Prasetia W. dan Abidin T. 2016. Perawatan Saluran Akar pada Sisa Akar Gigi dengan Restorasi Direk. *Jurnal PDGI*, 65(3): 83-89.
- Prayoga E. 2013. *Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (Piper betle L.) Dengan Metode Difusi Disk dan Sumuran Terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Purwanto H., Hartati I., dan Kurniasari L. 2010. Pengembangan *Microwave Assisted Extractor* (Mae) Pada Produksi Minyak Jahe Dengan Kadar Zingiberene Tinggi. *Momentum*, 6(2): 9-16.
- Razali N. M. and Wah Y. B. 2011. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Test. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1): 21-33.

- Rijayanti R. P. 2014. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (Mangifera foetida L.) terhadap Staphylococcus aureus secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura, Pontianak.
- Rohyani I. S., Aryanti E., dan Suripto. 2015. Kandungan Fitokimia Beberapa Jenis Tumbuhan Lokal yang Sering Dimanfaatkan Sebagai Bahan Baku Obat di Pulau Lombok. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 1(2): 388-391.
- Rosavina A. H. 2014. *Uji Efektivitas Ekstrak Rimpang Kencur (Kaempferia galanga) Sebagai Antibakteri Lactobacillus acidophilus secara in vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Roy A., Geetha R.V., and Lakshmi T. 2011. *Averrhoa bilimbi* Linn- Nature's Drug Store- A Pharmacological Review. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(3): 101-106.
- Ryska A. 2007. *Dental Caries*. (online), (<https://www.fnhk.cz/fs413/10cariesdentistry.pdf>), diakses 28 Agustus 2018.
- Safrida Y. D., Yulvizar C., dan Devira C. N. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Berpotensi Probiotik pada Ikan Kembung (*Rastrelliger sp*). *Depik*, 1(3): 1-4.
- Salim M., Sulistyaningrum N., Isnawati A., Sitorus H., Yahya, Ni'mah T. 2016. Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Kulit Buah Duku (*Lansium domesticum* Corr) dari Provinsi Sumatera Selatan dan Jambi. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 6(2): 117-128.
- Samaranayake L. 2012. *Essential Microbiology for Dentistry*, 4<sup>th</sup> Ed., Elsevier, Hong Kong. p. 52, 55, 124.
- Sardiani N., Litaay M., Budji R. G., Priosambodo D., Syahribulan, dan Dwyana Z. 2015. Potensi Tunikata *Rhopalaea sp* Sebagai Sumber Inokulum Bakteri Endosimbion Penghasil Antibakteri; 1 Karakterisasi Isolat. *Jurnal Alam dan Lingkungan*, 6 (11): 1-10.

- Sharma R. and Gupta A. 2014. Differentiation of Oral Streptococcal Species by Haemolysis in Blood Agar Medium in Vitro. *International Journal of Engineering and Advanced Technology (IJEAT)*, 3(4): 143-144.
- SMIs (UK Standards for Microbiology Investigations). 2014. Catalase Test. *Bacteriology Test Procedures*, 8 (3): 1-13.
- Spear M. 2018. What Does Acetone Alcohol Do to a Gram Stain. (online), (<https://sciencing.com/acetone-alcohol-do-gram-stain-8731379.html>), diakses 21 September 2018.
- Spellerberg B. and Brandt C. 2016. Laboratory Diagnosis of *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci). *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*.
- Sulaiman A.Y., Astuti P., dan Shita A. D. P. 2017. Uji Antibakteri Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*) terhadap Koloni *Streptococcus viridans*. *Indonesian Journal for Health Sciences*, 1(2): 1-6.
- Susanto L. 2014. *Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Gambir (Uncaria gambir Roxb) terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus mutans secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Tanumiharja M. 2010. Larutan Irigasi Saluran Akar. *Dentofasial*, 9 (2): 108-115.
- Tenggara E.J. 2014. *Daya Hambat Etanol Daun Sirsak (Annona muricata Linn) terhadap Streptococcus pyogenes secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Torabinejad M. and Walton R.E. 2008. *Endodontics: Principles and Practice*, 4<sup>th</sup> Ed., Saunders, Missouri. p. 38, 49.
- Usman H. dan Akbar P.S. 2012. *Pengantar Statistika*, Edisi kedua. PT Bumi Aksara, Jakarta. hal. 3, 114, 123, 197.
- Vanimakhal R.R. and Balasubramanian S. 2016. Phytochemical Qualitative Analysis and Total Tannin Content in the Aqueous Extract of *Areca catechu* Nut. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 6(54): 07-09.

- Wasitaningrum I.D.A. 2009. *Uji Resistensi Bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli dari Isolat Susu Sapi Segar terhadap beberapa Antibiotik*. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Widhianto E.K., Elmarda R.V., dan Rakhmawatie M.D. 2017. Effectivity *In Vitro* of *Averrhoa bilimbi L* Ethanolic Extract Againts *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus* Growth. (online), [https://www.researchgate.net/publication/320893786\\_Effectivity\\_in\\_vitro\\_of\\_Averrhoa\\_bilimbi\\_L\\_Ethanolic\\_Extract\\_Againts\\_Escherichia\\_coli\\_and\\_Staphylococcus\\_aureus\\_Growth](https://www.researchgate.net/publication/320893786_Effectivity_in_vitro_of_Averrhoa_bilimbi_L_Ethanolic_Extract_Againts_Escherichia_coli_and_Staphylococcus_aureus_Growth), diakses 30 Agustus 2018.
- Wiley J. M., Sherwood L. M., and Woolverton C. J. 2008. *Prescott, Harley and Klein's Microbiology*, 7<sup>th</sup> Ed., McGraw-Hill, New York. p. 840, 869.
- Xie Y., Yang W., Tang F., Chen X., and Ren L. 2015. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medical Chemistry*, 22(1): 132-149.
- Yamin I. F. dan Natsir N. 2014. Bakteri Dominan di dalam Saluran Akar Gigi Nekrosis. *Dentofasial*, 13 (2): 113-116.