



**EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK
DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*) TERHADAP
PERTUMBUHAN BAKTERI *Aggregatibacter
actinomycetemcomitans* SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
MEMPEROLEH GELAR SARJANA**

oleh :
**EARNEST NUR Z.A.
145070400111018**

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

HALAMAN PENGESAHAN

SKRIPSI

EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KENIKIR
(*Cosmos caudatus*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI
Aggregatibacter actinomycetemcomitans SECARA *IN VITRO*

oleh :
EARNEST NUR Z.A
145070400111018

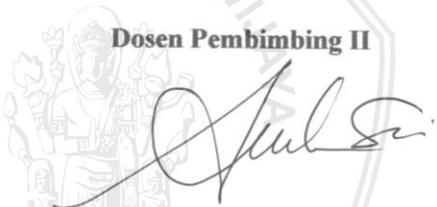
Telah diujikan di depan Majelis Penguji pada tanggal 31 Mei
2018 dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana dalam Bidang Kedokteran Gigi

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II


drg. Rudhanton, Sp.Perio
NIK. 2008086311081001


drg. Ambar Puspitasari, Sp.KGA
NIK. 2012087704122001

Malang,
Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya


drg. Kartika Andari Wulan, Sp.Pros
NIP. 197906112009122003

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan segala rahmat, karunia, serta ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul "Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Secara *In Vitro*".

Dengan selesainya penulisan Skripsi ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. drg. R. Setyohadi, MS , selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
2. drg. Kartika Andari Wulan, Sp.Prof , selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
3. drg. Viranda Sutanti, M.Si , sebagai penguji ujian Skripsi yang memberikan masukan dan arahan untuk menyempurnakan naskah Skripsi ini.
4. drg. Rudhanton, Sp.Perio , sebagai dosen pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, arahan, masukan, serta semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini.
5. drg. Ambar Puspitasari, Sp.KGA , sebagai dosen pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, arahan, masukan, serta semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi ini.

6. Seluruh anggota Tim Pengelola Skripsi Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
7. Kedua orang tua saya beserta keluarga besar yang selalu memberikan dukungan dan semangat serta doa terhadap saya
8. Pak Ali sebagai analis laboratorium selama saya melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi FK UB
9. Teman-teman FKG UB angkatan 2014 khususnya Ayu, Riri, Riris, Gumilang, Amar, Angga, Yoga dan Zihan yang selalu memberikan semangat serta motivasi kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
10. Semua pihak yang telah membantu penulis, yang tidak dapat penulis sebut satu-persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, saran dan kritik sangat diharapkan demi perbaikan ke depan. Semoga Skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan semua pihak yang membutuhkan.

Malang, Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

Judul	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Orisinalitas Skripsi	iii
Kata Pengantar	vi
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi.....	viii
Daftar Gambar.....	xi
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Lampiran	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>).....	7
2.1.1 Morfologi	7
2.1.2 Klasifikasi	8
2.1.3 Bahan Aktif.....	8
2.2 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	11
2.2.1 Klasifikasi Bakteri.....	11
2.2.2 Karakteristik Bakteri	11
2.2.3 Faktor Virulensi	12
2.2.4 Penyakit Rongga Mulut yang Disebabkan oleh Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	16
2.3 Efek Ekstrak Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>) terhadap Bakteri <i>Aggregatibacter</i>	

4.8 Analisis Data	40
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	41
5.1 Hasil Penelitian	41
5.1.1 Identifikasi Bakteri <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	41
5.1.1.1 Pewarnaan Gram.....	41
5.1.1.2 Uji Katalase	42
5.1.1.3 Uji Oksidase	43
5.1.1.4 Uji Hemolisis.....	43
5.1.1.5 Kultur <i>MacConkey</i>	44
5.1.2 Pembuatan Kultur Bakteri.....	45
5.1.3 Hasil Ekstraksi Daun Kenikir.....	46
5.1.4 Hasil Penelitian Pendahuluan.....	46
5.1.5 Hasil Difusi Sumuran.....	48
5.2 Analisis Data	52
5.2.1 Hasil Pengujian Normalitas Data.....	52
5.2.2 Hasil Uji <i>One-Way ANOVA</i>	53
5.2.3 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	53
5.2.4 Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i>	54
5.2.5 Hasil Uji Regresi.....	55
BAB VI PEMBAHASAN	57
BAB VII PENUTUP	63
7.1 Kesimpulan	63
7.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA.....	65

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>).....	7
Gambar 2.2 Koloni Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	12
Gambar 5.1 Pewarnaan Gram Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	42
Gambar 5.2 Uji Katalase Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	42
Gambar 5.3 Uji Oksidase Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	43
Gambar 5.4 Uji Hemolisis Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	44
Gambar 5.5 Kultur <i>MacConkey</i> Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	45
Gambar 5.6 Hasil Ekstrak Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>)	46
Gambar 5.7 Penelitian Pendahuluan Difusi Sumuran dengan Media BHIA	47
Gambar 5.8 Penelitian Pendahuluan Difusi Sumuran dengan Media NA	48
Gambar 5.9 Hasil Pengulangan Difusi Sumuran dengan Media NA	49
Gambar 5.10 Grafik Rerata Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> pada Ekstrak Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>).....	51

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>) terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	50
Tabel 5.2	Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i>	52
Tabel 5.3	Hasil Uji Homogenitas <i>Levene</i>	53
Tabel 5.4	Hasil Uji <i>One-Way ANOVA</i>	53
Tabel 5.5	Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	54



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Keterangan Determinasi Daun Kenikir.....	70
Lampiran 2	Surat Hasil Ekstrak Daun Kenikir.....	71
Lampiran 3	Dokumentasi Penelitian.....	72
Lampiran 4	Hasil Analisis Data.....	75



ABSTRAK

Auladana, Earnest Nur Zainun. 2018. *Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kenikir (Cosmos caudatus) terhadap Pertumbuhan Bakteri Aggregatibacter actinomycetemcomitans Secara In Vitro*. Skripsi. Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) drg. Rudhanton, Sp.Perio (2) drg. Ambar Puspitasari, Sp.KGA.

Periodontitis agresif merupakan infeksi bakteri yang merusak ligamen periodontal dan tulang alveolar secara luas dan singkat dalam waktu yang sangat cepat. Sering terjadi pada pasien dengan usia kurang dari 30 tahun. Pada gigi sulung, onset terjadi periodontitis agresif belum diketahui dengan pasti, tetapi kemungkinan muncul sekitar atau sebelum usia 4 tahun. Salah satu bakteri dominan penyebab periodontitis agresif adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Daun kenikir (*Cosmos caudatus*) merupakan salah satu tanaman yang mengandung senyawa aktif flavonoid, terpenoid, saponin, tanin dan alkaloid yang berpotensi sebagai antimikroba. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*. Penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan metode difusi sumuran untuk mendapatkan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Konsentrasi ekstrak daun kenikir yang digunakan adalah 0%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90% dan 100%. Analisis data menggunakan *One-Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada perubahan konsentrasi ekstrak daun kenikir terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak maka daya antibakteri semakin efektif. Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kenikir mempunyai efek sebagai antibakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Kata kunci : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, daun kenikir (*Cosmos caudatus*), antibakteri, zona hambat

ABSTRACT

Auladana, Earnest Nur Zainun. 2018. *The Effectiveness of Kenikir Leaf Extract (Cosmos caudatus) as Antibacterial on The Growth of Aggregatibacter actinomycetemcomitans In Vitro*. Skripsi. Dentistry Education Study Program Faculty of Dentistry Universitas Brawijaya. Supervisor: (1) drg. Rudhanton, Sp.Perio (2) drg. Ambar Puspitasari, Sp.KGA.

Aggressive periodontitis is a bacterial infection that damages periodontal ligaments and alveolar bone extensively and rapidly in a very short time. Usually affecting patients under 30 years old. In primary dentition, the exact time of onset is unknown but it appears to arise around or before 4 years old. One of the dominant bacteria that cause aggressive periodontitis is *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The kenikir leaf (*Cosmos caudatus*) is one of the plants that contain active compounds of flavonoids, terpenoids, saponins, tannins and alkaloids that have antimicrobial potency. The purpose of this study to determine the effectiveness of kenikir leaf extract (*Cosmos caudatus*) as antibacterial in inhibiting the growth of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. This research was a laboratory experimental study using well diffusion method to obtain the inhibition zone diameter of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bacteria. The concentration of leaves extract used were 0%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90% and 100%. Data analysis using One-Way ANOVA showed a significant difference in the concentration of kenikir leaf extract (*Cosmos caudatus*) to inhibition zone of bacterial growth of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The increasing concentration of extract the more effective antibacterial potency. Based on this research, in can be concluded that kenikir leaf extract (*Cosmos caudatus*) has antibacterial potency against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Keywords : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, kenikir leaf (*Cosmos caudatus*), antibacterial, inhibition zone

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit periodontal merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut yang memiliki prevalensi yang cukup tinggi di masyarakat. Di Indonesia, penyakit periodontal menduduki peringkat kedua setelah karies. Menurut hasil survei Departemen Kesehatan, prevalensi penyakit periodontal di Indonesia sebesar 24,82% (Tenggara dkk., 2014). Salah satu penyakit periodontal dengan tingkat penyebaran yang luas dalam masyarakat yaitu periodontitis. Periodontitis merupakan suatu infeksi dari mikroorganismenya yang menyebabkan infeksi dan peradangan jaringan pendukung gigi, biasanya menyebabkan kerusakan ligamen periodontal dan tulang alveolar dengan membentuk poket, resesi atau keduanya. Periodontitis agresif merupakan salah satu macam dari periodontitis yang menyebabkan kerusakan ligamen periodontal dan tulang alveolar secara luas dalam waktu yang sangat cepat. Pada periode gigi sulung ataupun gigi pergantian, periodontitis agresif dapat terjadi berupa periodontitis agresif lokalisata maupun generalisata. Onset terjadinya periodontitis agresif belum diketahui secara pasti, tetapi dimungkinkan muncul sebelum atau saat usia 4 tahun (Newman *et al.*, 2015; Mc Donald *et al.*, 2011).

Salah satu bakteri penyebab periodontitis agresif adalah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Frekuensi bakteri

Aggregatibacter actinomycetemcomitans pada periodontitis agresif sekitar 70-90%. Angka tersebut jauh lebih tinggi dibandingkan pada periodontitis kronis sebanyak 21% dan pada individu yang sehat sebanyak 17%, sehingga *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri dominan yang menyebabkan periodontitis agresif (Newman *et al.*, 2015). Bakteri ini merupakan bagian dari flora normal rongga mulut pada individu yang sehat. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memiliki faktor virulensi yang dapat mengakibatkan kerusakan jaringan (Mythiereyi dan Krishnababa, 2012).

Perawatan periodontitis agresif sama seperti penyakit periodontal lainnya yaitu perawatan non bedah berupa *scaling* dan *root planing* serta perawatan bedah berupa flap periodontal (Joshipura *et al.*, 2015). Kerusakan tulang yang luas pada periodontitis agresif sering kali mempersulit perawatan, maka pemberian antibakteri sering digunakan untuk menunjang perawatan. Pemberian antibakteri berupa chlorhexidin dalam sediaan obat kumur yang digunakan untuk menunjang perawatan *scaling* dan *root planning* menghasilkan hasil yang lebih baik daripada tanpa penggunaan chlorhexidin saat perawatan (da Costa *et al.*, 2017). Akan tetapi penggunaan chlorhexidin dapat menyebabkan reaksi alergi dan bersifat toksik. Oleh karena itu, perlu upaya alternatif untuk mengontrol penyakit periodontal yang ada di masyarakat (Tenggara dkk., 2014).

Alternatif dari antibiotik sistemik yang dapat digunakan sebagai perawatan periodontitis adalah bahan herbal. Salah satu

tanaman yang memiliki khasiat antibakteri yaitu daun kenikir (*Cosmos caudatus*). Daun kenikir dapat dikonsumsi sebagai sayuran, untuk obat penambah nafsu makan, penguat tulang dan mengobati gastritis. Dari hasil studi fitokimia daun kenikir yang diekstrak menggunakan etanol dan pelarut lainnya, menunjukkan adanya senyawa aktif flavonoid, terpenoid, saponin, tanin, alkaloid dan minyak atsiri yang berpotensi sebagai antibakteri. Senyawa aktif tersebut dapat mengganggu permeabilitas membran sel, mengganggu pembentukan peptidoglikan, mendenaturasi protein dan inaktivasi enzim pada sel bakteri (Dwiyanti dkk., 2014).

Penelitian terdahulu mengenai daun kenikir telah membuktikan bahwa daun kenikir yang sudah diekstrak dengan menggunakan etanol dan pelarut lainnya memiliki daya antibakteri pada *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans* (Rasdi dkk., 2010). Berdasarkan data-data tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk menguji efektivitas antibakteri dari daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) efektif sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efektivitas ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan ukuran zona hambat ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*.
2. Mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat akademis

1. Memperkaya pengetahuan terkait potensi daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai antibakteri untuk tindakan preventif dan kuratif terhadap manifestasi penyakit infeksi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan oleh peneliti lain sebagai dasar penelitian selanjutnya untuk menguji efek ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai antibakteri bagi bakteri lain.

1.4.2 Manfaat praktis

Mengembangkan informasi kepada masyarakat tentang manfaat daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai antibakteri khususnya terhadap penyakit jaringan periodontal.





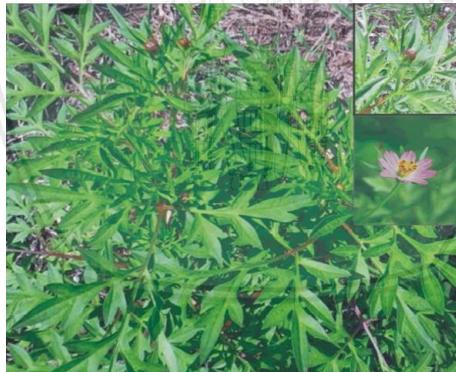
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*)

Tanaman kenikir dapat tumbuh dengan baik di dataran rendah hingga ketinggian 700 m dpl pada kondisi tanah yang gembur, liat dan memiliki drainase yang baik. Tanaman ini dapat tumbuh dengan baik pada tempat yang terbuka dengan sinar matahari penuh (Hidayat dkk., 2015).

Tanaman kenikir berasal dari dataran Amerika. Saat ini penyebarannya sudah meluas terutama daerah tropis termasuk Indonesia dimana sinar matahari dapat diperoleh sepanjang tahun (Hidayat dkk., 2008).



Gambar 2.1 *Cosmos caudatus*
(Bunawan, 2014)

2.1.1 Morfologi

Tanaman kenikir biasanya memiliki tinggi mencapai 150 cm, daunnya memiliki bentuk seperti pipa yang bergaris

membujur, lebar 2-3 cm. Memiliki bau yang khas. Bunga berbentuk karangan yang terdapat pada ujung batang, berwarna lembayung dan berbintik kuning pada tengahnya. Buah dari tanaman kenikir berbentuk seperti jarum dan keras (Hidayat dkk., 2015).

2.1.2 Klasifikasi

Menurut Sharifuldin (2014) klasifikasi daun kenikir adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Subdivisi : Magnoliopsida
Classes : Asteranea
Ordo : Asterales
Genus : *Cosmos*
Species : *Cosmos caudatus*

2.1.3 Bahan Aktif

Daun kenikir (*Cosmos caudatus*) diketahui mengandung fitokimia antara lain saponin, alkaloid, flavonoid, fenol dan terpenoid. Kenikir memiliki aktifitas antimikroba yang baik pada bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif dan juga fungi (Karimy dkk., 2013). Berbagai jenis fitokimia tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan pathogen (Yusoff *et al.*, 2015).

Penghambatan pertumbuhan bakteri disebabkan oleh interaksi senyawa aktif melalui difusi zat antimikroba dengan bakteri. Interaksi senyawa aktif tersebut menyebabkan gangguan atau kerusakan pada protein, membran dan dinding sel, perubahan

permeabilitas membran sel dan penghambatan kerja enzim (Pelczar dan Chan, 1988 *dalam* Dwiyantri dkk., 2014).

Flavonoid merupakan senyawa aktif yang memiliki fungsi untuk mengganggu sintesis dinding sel bakteri sehingga terjadi kebocoran plasma yang diakhiri dengan lisisnya bakteri. Flavonoid juga berfungsi untuk menghambat DNA gyrase dan menghambat aktivitas enzim ATPase bakteri (Dewi dkk., 2013). Dalam penelitian Chotiah dkk. (2015) ditemukan senyawa isokuerstrin yang merupakan golongan flavonoid. Senyawa tersebut yang menunjukkan adanya zona hambat terhadap bakteri (Chotiah dkk, 2015).

Toksitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, mekanisme kerja senyawa tanin dalam menghambat sel bakteri yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri, menghambat fungsi selaput sel (transport zat dari sel satu ke sel yang lain) dan menghambat sintesis asam nukleat sehingga pertumbuhan bakteri dapat terhambat. Tanin dapat membentuk kompleks dengan protein dan interaksi hidrofobik, jika terbentuk ikatan hidrogen antara tanin dengan protein enzim yang terdapat pada bakteri maka kemungkinan akan terdenaturasi sehingga metabolisme bakteri terganggu, selain itu dengan adanya tanin maka akan terjadi penghambatan metabolisme sel, mengganggu sintesa dinding sel dan protein dengan mengganggu aktivitas enzim (Rozlizawaty dkk., 2013).

Minyak atsiri dalam ekstrak daun kenikir dapat menghambat pertumbuhan atau mematikan kuman dengan

mengganggu proses terbentuknya membran dan/atau dinding sel; membran atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Ajizah, 2004 *dalam* Dwiyantri dkk., 2014). Gangguan tersebut diakibatkan dari terpenoid yang terkandung dalam minyak atsiri. Terpenoid akan mengikat protein, lipid atau karbohidrat pada membran atau dinding sel (Harborne, 1987 *dalam* Dwiyantri dkk., 2014).

Saponin merupakan salah satu golongan glikosida yang mempunyai struktur steroid dan tripenoid. Saponin berfungsi sebagai penghambat kolonisasi bakteri, penurunan tegangan permukaan medium ekstraseluler, atau dengan cara melisiskan membran sel bakteri. Saponin juga berfungsi mengganggu permeabilitas membran sel bakteri yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Zahro dan Agustini, 2013).

Alkaloid adalah senyawa yang memiliki mekanisme menghambat bakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Njeru *et al.*, 2013). Alkaloid merupakan senyawa yang lebih berefek pada bakteri gram positif dibandingkan pada gram negatif. Alkaloid bekerja sebagai DNA interkalator dan penghambat sintesis DNA dengan cara menghambat topoisomerase (Dewi dkk., 2013).

2.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans merupakan bakteri flora normal rongga mulut pada individu yang sehat. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dapat menjadi patogen atau menjadi agen utama dalam penyakit periodontal. Salah satu penyakit periodontal yang disebabkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah periodontitis agresif (Newman *et al.*, 2015).

2.2.1 Klasifikasi bakteri

Menurut taksonominya *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diklasifikasi berdasarkan (Norskov – Lauritsen *et al.*, 2006) :

Kingdom : *Bacteria*
 Filum : *Proteobacteria*
 Kelas : *Gammaproteobacteria*
 Ordo : *Parteurellales*
 Famili : *Pasteurellaceae*
 Genus : *Aggregatibacter*
 Spesies : *Actinomycetemcomitans*

2.2.2 Karakteristik Bakteri

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri non motil, kecil, Gram negatif, *capnophilic*, kokobasil, fakultatif anaerob dan tumbuh baik pada 5% CO₂ di udara atau anaerob. Tumbuh berkembang baik menjadi koloni dalam 24-48 jam. Dalam media pertumbuhan yang padat, bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang baru diisolasi melekat pada agar dan terdapat koloni yang melingkar dengan

diameter 0,5-1 mm dengan tepi yang sedikit tidak teratur (Mythireyi dan Krishnababa, 2012).



Gambar 2.2 Koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
(Mythireyi dan Krishnababa, 2012)

2.2.3 Faktor virulensi

Virulensi merupakan kemampuan mikroorganisme untuk menyebabkan terjadinya infeksi. Sifat virulensi dari mikroorganisme patogen mencakup kemampuan untuk menginduksi interaksi host dengan mikroba, merusak pertahanan normal host, menginvasi host, replikasi pada lingkungan baru, dan menampilkan sifat patogen yang terspesialisasi. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memiliki faktor virulensi yang berfungsi untuk memediasi adhesinya *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada permukaan gingiva (Kler *et al.*, 2010).

1. Leukotoksin

Leukotoksin dari *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dapat membunuh leukosit

polimorfonuklear (PMN) dan makrofag. Leukotoksin dapat membunuh sel dengan cepat dalam hitungan menit yang disebabkan dari pembentukan pori-pori pada membran sel dari sel target. Lisis sel disebabkan oleh pembentukan yang cepat dari saluran ion secara kondusif sehingga menyebabkan depolarisasi membran, kehilangan K^+ intraseluler, osmosis sel dan dilanjutkan dengan kematian sel (Johansson, 2011).

2. Superantigen

Superantigen mampu mengaktifkan apoptosis dari sel T yang merupakan konsekuensi dari pengaktifan sel T dengan reseptor spesifik V beta sel T. Sehingga superantigen dapat dianggap sebagai immunosupresan. Superantigen bukan hanya alat yang ampuh untuk studi reaksi imunologi tetapi juga penggunaannya terlibat dalam intervensi terapeutik (Vaishnani, 2009).

3. *Cytolethal Distending Toxin (CDT)*

Cytolethal Distending Toxin (CDT) dari bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dapat menghambat pertumbuhan dari sel epitel, *CDT* mengikat reseptor spesifik gangliosida GM3 dalam nukleus menggunakan enzim DNA yang seperti nuclease yang menyebabkan fragmentasi DNA sehingga menghambat siklus sel G0/G1 dan G2/M dan menghambat sel memasuki fase mitosis. Kerusakan rantai DNA tersebut

merupakan awal dari terjadinya apoptosis sel (Setiawatie, 2012).

4. *Fc Binding Proteins*

Wilayah antibodi *Fc* penting dalam pengikatan antibodi terhadap reseptor spesifik pada leukosit polimorfonuklear. Setiap protein bersaing untuk daerah ini menghambat pengikatan antibodi sehingga menghambat fagositosis. Reseptor *Fc* yang terdapat pada permukaan bakteri dapat menghambat aktivasi komplemen (Sriraman, 2014).

5. *Chemotactic inhibitor*

Neutrofil ditarik menuju daerah yang terinfeksi dengan mengikuti gradien konsentrasi dari sinyal kemotaksis. Gangguan dari kemotaksis neutrofil menguntungkan bagi organisme penyebab infeksi. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* telah terbukti mampu menghambat kemotaksis (Mythireyi dan Krishnababa, 2012).

6. **Faktor Immunosuppressive**

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* terbukti mampu menghambat DNA, RNA dan sintesis protein dalam sel T yang teraktivasi oleh mitogen atau antigen. Protein murni mampu menghambat IgG dan IgM yang diproduksi oleh sel B dan mempengaruhi produksi immunoglobulin dengan mengganggu tahapan awal dari aktivasi sel. Meskipun mekanisme yang tepat dimana

faktor immunosupresif dapat menyebabkan immunosupresi belum diketahui, namun tampak bahwa faktor immunosupresif mempengaruhi regulasi dari limfosit B dan sel T (Mythireyi dan Krishnababa, 2012).

7. **Lipopolisakarida**

Lipopolisakarida merupakan salah satu komponen membran bakteri gram negatif penyebab sepsis patogenik. Lipopolisakarida merupakan komponen yang paling imunogenik dari dinding sel bakteri gram negatif (Widyawati, 2014).

Lipopolisakarida menginduksi produksi sitokin seperti *IL-6*, *IL-8*, *IL-1B* dan *TNF α* dari sel host yang berbeda sehingga mempromosikan reaksi inflamasi (Mythireyi dan Krishnababa, 2012). Selain menjadi agen inflamatoris yang kuat dan berperan penting pada penyakit periodontal inflamatoris, lipopolisakarida juga mempunyai efek sitotoksik secara langsung pada sel-sel periodonsium (Widjaja, 2011).

8. **Cell Stress Protein (Chaperonin 60)**

Merupakan molekul yang disekresikan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan menstimulasi resorpsi tulang dengan bertindak sebagai osteoklas. Resorpsi tulang menunjukkan “*burn out phenomenon*” yaitu dimana resorpsi tulang berkurang karena respon imun dari host itu sendiri (Sriraman, 2014).

9. *Actinomycetemcomitina*

Lima *et al.* (2008) dalam Mythireyi dan Krishnababa (2012) mengisolasi *Actinomycetemcomitina* yang merupakan bakteriosin baru yang diproduksi dari bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang aktif terhadap *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337. *Actinomycetemcomitina* diproduksi selama fase pertumbuhan eksponensial dan stasioner dan jumlahnya menurun sampai menghilang selama penurunan fase pertumbuhan (Paino, 2013).

2.2.4 Penyakit pada Rongga Mulut yang Disebabkan oleh Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Beberapa spesies bakteri gram negatif yang berkolonisasi pada plak subgingiva adalah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* dan *Fusobacterium nucleatum* yang pada umumnya menjadi bakteri penyebab periodontitis. Periodontitis merupakan penyakit peradangan pada jaringan penyangga gigi yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Periodontitis dapat menyebabkan kerusakan ligament periodontal, tulang alveolar, membentuk poket resesi atau keduanya (Fidary & Lessang, 2008).

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri yang dominan pada periodontitis agresif. Periodontitis agresif merupakan salah satu macam dari periodontitis yang sering terjadi pada pasien yang memiliki usia kurang dari 30 tahun, dan merusak ligamen periodontal dan tulang

alveolar secara luas dan singkat dalam waktu yang sangat cepat (Newman *et al.*, 2015).

Periodontitis agresif terdiri dari periodontitis agresif lokalisata dan periodontitis agresif generalisata. Pada periodontitis agresif lokalisata terjadi kehilangan perlekatan pada dua molar pertama permanen dan insisivus pertama. Biasanya lebih banyak terjadi pada usia muda sekitar 12-17 tahun pada proses pertumbuhan gigi permanen. Pada periodontitis agresif generalisata terjadi kehilangan perlekatan pada setidaknya tiga gigi yang bukan gigi molar pertama dan insisivus pertama. Jarang terjadi pada usia muda tetapi pada usia kurang dari 30 tahun. Dapat juga terjadi pada usia diatas 30 tahun (Newman *et al.*, 2015).

Periodontitis agresif pada gigi sulung bisa terjadi dalam bentuk periodontitis agresif lokalisata maupun dalam bentuk generalisata. Periodontitis agresif lokalisata pada gigi sulung adalah kehilangan perlekatan terlokalisir dan kehilangan tulang alveolar pada gigi sulung. Waktu onset yang tepat tidak diketahui, tetapi kemungkinan muncul sekitar atau sebelum usia 4 tahun ketika terjadi kehilangan tulang yang terlihat pada radiograf di sekitar gigi molar dan atau insisivus sulung. Dampak yang terjadi pada gigi sulung yang terkena periodontitis agresif lokalisata yaitu terjadi kedalaman poket yang abnormal dengan diikuti inflamasi gingiva, kehilangan tulang yang cepat dan jumlah plak yang minimal pada gigi sulung tersebut. Periodontitis agresif generalisata yang terjadi pada anak-anak biasanya bermula saat atau setelah erupsi gigi sulung. Hal tersebut menghasilkan

inflamasi gingiva yang parah, kehilangan perlekatan jaringan periodontal secara menyeluruh, terjadi mobilitas gigi dan kerusakan tulang alveolar secara cepat dengan eksfoliasi prematur gigi (Mc Donald *et al.*, 2011).

2.3 Efek Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) Terhadap Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) mempunyai beberapa senyawa yang diyakini mampu memberikan efek pada bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Salah satu zat yang bertanggung jawab sebagai antibakteri pada daun kenikir adalah flavonoid (Chotiah, 2015).

Flavonoid mengakibatkan gangguan metabolisme pada sel bakteri. Gugus fenol dari senyawa flavonoid berikatan dengan protein bakteri melalui ikatan hidrogen, mengakibatkan struktur protein menjadi rusak dan enzim menjadi inaktif. Pada perusakan membran sel, ion H^+ dari senyawa fenol akan menyerang gugus polar sehingga molekul fosfolipid terurai menjadi asam fosfat, gliserol dan asam karboksilat. Kondisi ini menyebabkan membran sel bakteri akan bocor dan sel bakteri akan lisis (Dwiyanti, 2014).

2.4 Ekstrak

2.4.1 Macam Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir

semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Darma, 2014).

Macam ekstrak dibagi berdasarkan sifatnya (Departemen Kesehatan RI, 1995 *dalam* Darma, 2014) :

1. Ekstrak encer, sediaan yang masih dapat dituang
2. Ekstrak kental, sediaan yang tidak dapat dituang dan memiliki kadar air sampai 30%
3. Ekstrak kering, sediaan yang berbentuk serbuk dan dibuat dari ekstrak tumbuhan yang diperoleh dari penguapan bahan pelarut
4. Ekstrak cair, mengandung simplisia nabati yang mengandung etanol sebagai bahan pengawet

2.4.2 Macam Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa aktif dari suatu simplisia tanaman menggunakan pelarut tertentu untuk memisahkan senyawa yang terlarut sehingga terpisah dari bahan yang tidak terlarut atau residu (Azwanida, 2015). Beberapa metode yang banyak digunakan untuk ekstraksi bahan alam yaitu:

1. Maserasi

Maserasi merupakan proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Proses ekstraksi dilakukan pada kondisi laboratorium dengan suhu 22°C, tempat yang kering selama tujuh hari, dengan sesekali dilakukan pengadukan untuk meningkatkan proses maserasi. Setelah

tujuh hari, ekstrak maserasi disaring melalui kertas saring dan dipampatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan pada suhu 60°C hingga berat konstan. Ekstrak kering disimpan dalam botol kaca gelap pada suhu 4°C untuk mencegah kerusakan oksidatif (Dukic *et al.*, 2017).

2. Perkolasi

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode ini adalah sampel selalu dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Mukhriani, 2014).

3. Soxhlet

Metode *soxhlet* dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux. Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil

kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus menerus berada pada titik didih (Mukhriani, 2014).

4. Digesti

Metode digesti merupakan maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan yaitu pada suhu 35° - 40°C untuk meningkatkan efisiensi dari proses ekstraksi (Sharifi *et al.*, 2017).

5. Refluks

Pada metode refluks, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu (Mukhriani, 2014).

6. Infusa

Infusa adalah metode ekstraksi dengan pelarut air pada suhu penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih), suhu terukur (96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit) (Azwanida, 2015).

7. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan suhu sampai titik didih air yaitu pada suhu 90-100°C selama 30 menit (Azwanida, 2015).

2.5 Uji Kepekaan Antimikroba

Uji dari mikroba yang spesifik adalah dengan melihat aktivitas daripada kandungan agen antimikroba dan juga mempelajari serta menentukan pengaruhnya (Ricki, 2011). Beberapa uji dapat di gunakan untuk menguji aktivitas antimikroba, antara lain:

2.5.1 Dilusi

Metode dilusi dilakukan dengan mencampurkan zat antimikroba dan media agar. Kemudian diinokulasikan dengan mikroba uji. Aktivitas antimikroba ditentukan dengan melihat konsentrasi hambat minimum (KHM) yang merupakan konsentrasi terkecil dari zat antimikroba uji yang memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji. Metode ini terdiri atas dua cara, yaitu (Pratiwi, 2008):

1. Pengenceran serial dalam tabung

Dilakukan dengan cara menggunakan tabung reaksi yang diisi dengan bakteri dan larutan antibakteri dalam beberapa konsentrasi. Zat yang akan diuji aktivitas bakterinya dilakukan pengenceran sesuai dengan serial dalam media cair, kemudian diinokulasikan dengan bakteri lalu diinkubasi pada waktu dan suhu yang sesuai dengan bakteri uji. Aktivitas zat merupakan kadar hambat minimal (KHM)

2. Penipisan lempeng agar

Zat antibakteri dilakukan pengenceran dalam media agar lalu dituang kedalam cawan petri. Ditunggu hingga agar membeku kemudian diinokulasikan bakteri. Lalu diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Konsentrasi terendah dari larutan zat antibakteri yang masih memberikan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri merupakan konsentrasi hambat minimal (KHM)

2.5.2 Difusi

Penentuan aktivitas berdasarkan kemampuan difusi zat antimikroba dalam lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji. Hasilnya diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambat yang terbentuk di sekeliling zat antimikroba pada waktu tertentu masa inkubasi. Menurut Prayoga (2013) metode ini dapat dilakukan dengan 3 cara:

1. Cara Cakram/*Disc*

Merupakan cara yang paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan bakteri terhadap berbagai macam obat-obatan. Menggunakan suatu cakram kertas saring (*paper disc*) dengan ukuran sekitar 6 mm yang mengandung zat antimikroba. Kemudian kertas saring diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi bakteri uji lalu diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu sesuai dengan kondisi bakteri uji. Zat antimikroba akan berdifusi ke dalam agar dan

menghambat pertumbuhan bakteri uji. Hasil yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Balouiri, 2016).

2. Cara Parit/*Ditch*

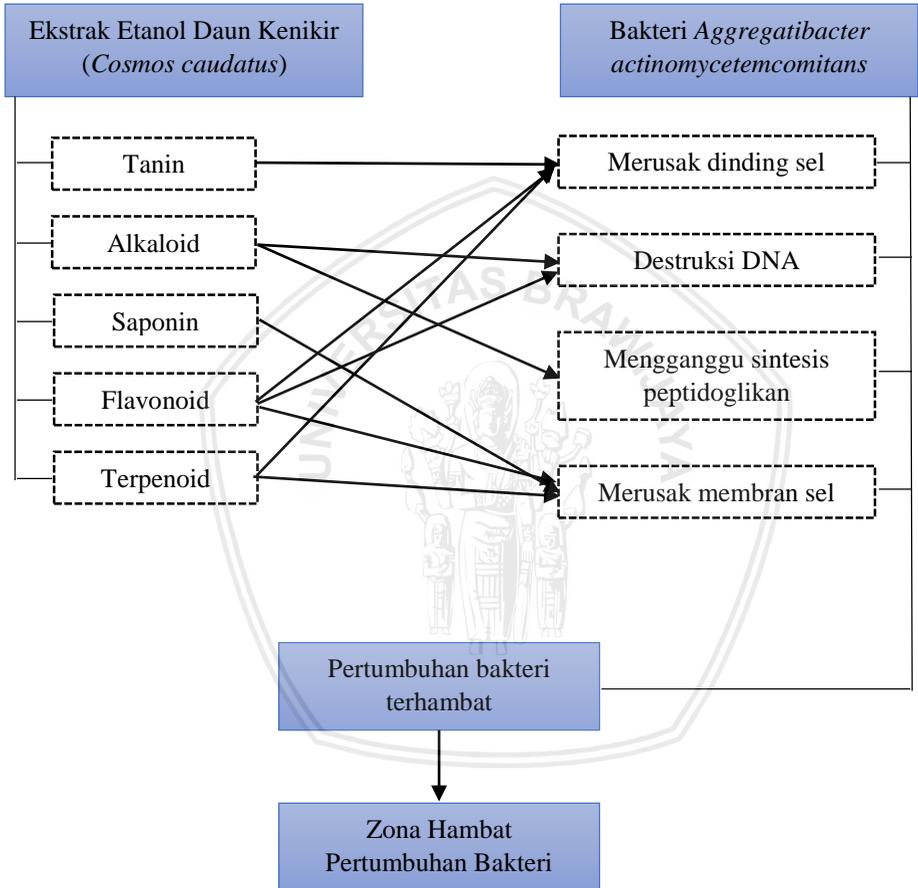
Lempeng agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dibuat sebidang parit. Parit tersebut berisi zat antimikroba lalu diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu sesuai bakteri uji. Hasil yang diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambat yang terbentuk di sekitar parit (Prayoga, 2013).

3. Cara Sumuran/*hole*

Lempeng agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dibuat lubang sebesar 5-8 mm yang kemudian diisi dengan zat antimikroba. Setelah terisi zat antimikroba, lalu diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu sesuai bakteri uji. Hasil yang diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambatan yang terbentuk di sekeliling lubang. Zat antimikroba berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan bakteri yang diuji (Balouiri, 2016).

BAB III HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :

- : variabel yang diteliti
- : variabel yang tidak diteliti

3.2. Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan ekstrak etanol daun kenikir (*Cosmos caudatus*). Kandungan dari ekstrak tersebut yang bersifat sebagai antibakteri adalah alkaloid, saponin, tanin, terpenoid dan flavonoid. Senyawa alkaloid mengganggu sintesis peptidoglikan pada dinding sel bakteri sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Alkaloid bekerja sebagai DNA interkalator dan penghambat sintesis DNA. Saponin berfungsi mengganggu permeabilitas membran sel bakteri yang mengakibatkan kerusakan membran sel. Flavonoid merupakan senyawa aktif yang memiliki fungsi untuk mengganggu sintesis dinding dan membran sel bakteri sehingga terjadi kebocoran plasma yang diakhiri dengan lisisnya bakteri. Flavonoid juga berfungsi untuk menghambat DNA gyrase dan menghambat aktivitas enzim ATPase bakteri. Terpenoid yang terkandung dalam ekstrak daun kenikir dapat menghambat pertumbuhan atau mematikan kuman dengan mengganggu proses terbentuknya membran dan/atau dinding sel; membran atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna. Terpenoid akan mengikat protein, lipid atau karbohidrat pada membran atau dinding sel. Toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri.

Adanya kandungan senyawa-senyawa tersebut pada ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) akan menyebabkan

pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* terhambat ditandai dengan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk semakin besar.

3.3. Hipotesis

Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) efektif sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*.





BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental post test only control group design*. Metode penelitian menggunakan metode difusi sumuran untuk mengetahui kemampuan antibakteri ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari-Februari 2018

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya, Jawa Timur dan telah dilakukan identifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Daun Kenikir didapatkan dari di UPT Materia Medica Batu, Kota Batu, Jawa Timur.

4.3.1 Variabel Penelitian

Variabel bebas :ekstrak etanol daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan konsentrasi 30%, 45%, 60%, 75%, 90% dan 100% (Astutiningrum, 2016)

Variabel terikat :pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.3.2 Pengulangan Sampel

Banyaknya pengulangan yang digunakan pada penelitian ini dapat ditentukan dengan menggunakan rumus Federer (1977) dalam Risqi (2016) berikut :

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

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

(dibulatkan menjadi 4)

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan rumus diatas, banyaknya pengulangan pada penelitian ini sebanyak 4 kali.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

- a. Timbangan
- b. Maserator berpengaduk elektronik
- c. Blender
- d. *Rotary evaporator*
- e. Tabung reaksi
- f. Pinset
- g. Cawan petri
- h. Mikropipet
- i. Ose
- j. Perforator
- k. Jangka sorong
- l. Mikroskop
- m. Lampu spiritus
- n. Inkubator
- o. Spektofotometer

4.4.2 Bahan

- a. Kultur bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- b. Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*)
- c. Medium BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)
- d. Medium NA (*Nutrient Agar*)
- e. Bahan uji katalase : H₂O₂ 3%
- f. Bahan pengecatan Gram : lugol, kristal violet, safranin, dan alkohol 96%

- g. Bahan uji oksidase : reagen oksidase
- h. Bahan uji hemolisis : media BAP (*Blood Agar Plate*)
- i. Bahan kultur *MacConkey* : media agar *MacConkey*
- j. Minyak imersi
- k. Akuades steril
- l. Etanol 96%
- m. NaCl 0,85%
- n. Kertas saring

4.5 Definisi Operasional

1. Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) adalah ekstrak dari daun kenikir yang diperoleh melalui proses maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) didapatkan dari di UPT Materia Medica Batu, Kota Batu, Jawa Timur. Kelompok perlakuan dalam penelitian ini adalah kelompok yang diberi ekstrak etanol daun kenikir dengan konsentrasi 30%, 45%, 60%, 75%, 90% dan 100%. Skala yang digunakan berupa rasio.
2. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur.
3. Uji kepekaan antibakteri metode difusi sumuran adalah uji yang dilakukan secara *in vitro* pada agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dan dibuat lubang sebesar 5-8 mm yang kemudian diisi dengan zat antimikroba.

Hasil yang diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambatan yang terbentuk di sekeliling lubang. Zona hambat adalah diameter daerah bening yang terbentuk pada biakan medium bakteri setelah diinkubasi yang diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm. Skala yang digunakan berupa rasio.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pembuatan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*)

- a. Timbang serbuk daun kenikir sebanyak 750 gram
- b. Lakukan pembasahan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 750 ml
- c. Masukkan serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan ditambahkan pelarut etanol 96% sampai terendam (pelarut yang digunakan minimal 2 kali berat atau lebih). Pelarut yang ditambahkan sebanyak 3 L. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam. Dan dishaker di atas shaker digital dengan kecepatan 50 rpm.
- d. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmayer.
- e. Ampas dimasukkan lagi dalam toples dan tambahkan pelarut sampai terendam (minimal pelarut 5 cm di atas permukaan), dalam hal ini digunakan 3 L.
- f. Biarkan semalam atau 24 jam di atas shaker kecepatan 50 rpm.

- g. Remaserasi dilakukan sampai filtrat/ekstrak lebih jernih, menggunakan 2 L pelarut.
- h. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator. Diperlukan waktu 7 jam untuk evaporasi.
- i. Ekstrak yang dihasilkan dievaporasi/diuapkan diatas water bath selama 2 jam.
- j. Diperoleh hasil akhir ekstrak etanol daun kenikir dengan konsentrasi 100%.
- k. Dilakukan pengenceran ekstrak menjadi 30%, 45%, 60%, 75%, 90%
- l. Sehingga didapatkan konsentrasi 0%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90% dan 100% (Astutiningrum, 2016)

4.6.2 Uji Identifikasi Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

4.6.2.1 Pewarnaan Gram

- a. Dibuat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan di udara
- b. Sediaan yang telah kering difiksasi diatas api bunsen
- c. Sediaan diberi larutan Kristal violet selama 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir
- d. Sediaan diberi larutan lugol selama 1 menit kemudian dibilas dengan air mengalir
- e. Diberi larutan alkohol 96% selama 5-10 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir

- f. Sediaan diberi safranin dan didiamkan selama 30 detik kemudian dibilas dengan air mengalir
- g. Dikeringkan menggunakan kertas penghisap kemudian ditetesi minyak emersi dan dilihat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x
- h. Hasil pewarnaan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* berwarna merah yang menunjukkan bakteri gram negatif (Cahyani, 2013)

4.6.2.2 Tes Katalase

- a. Sediakan perbenihan bakteri pada *object glass*
- b. Sediaan ditetes larutan H₂O₂ 3%
- c. Kemudian diamati timbulnya gelembung-gelembung udara pada *object glass*
- d. Jika timbul gelembung maka hasil tes katalase positif (Santoso, 2013)

4.6.2.3 Uji Hemolisis

Uji hemolisis dilakukan dengan cara *streaking* bakteri pada media *Blood Agar Plate* (BAP) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan pada BAP. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil non hemolisis atau γ -hemolisis yaitu tidak tampak perubahan pada BAP (Risqi, 2016).

4.6.2.4 Uji Oksidase

- a. Mengambil koloni bakteri dari media padat kemudian digoreskan pada kertas saring yang telah ditetesi

dengan reagen oksidase yaitu tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida 1% (Kovac)

- b. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil positif yaitu warnanya berubah menjadi warna ungu, ungu tua hingga kehitaman (Syahrurachman, 2009)

4.6.2.5 Kultur Agar MacConkey

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diinokulasi pada medium agar MacConkey dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian diamati hasilnya. Apabila warna media berubah menjadi warna merah maka bakteri uji menfermentasi laktosa (Risqi, 2016).

4.6.3 Pembuatan kultur bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

- a. Disiapkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang telah diidentifikasi dibiakkan menggunakan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) selama 24 jam pada suhu 37°C
- b. Ambil 5 koloni dengan diameter ≥ 1 mm dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur kekeruhannya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dan *Optical Density* (OD) 0,1 (Murray *et al.*, 1999 dalam Risqi, 2016)
- c. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml dilakukan dengan

cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^6 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml. Proses dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk pengujian yaitu sebesar $1,5 \times 10^6$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999 dalam Risqi, 2016)

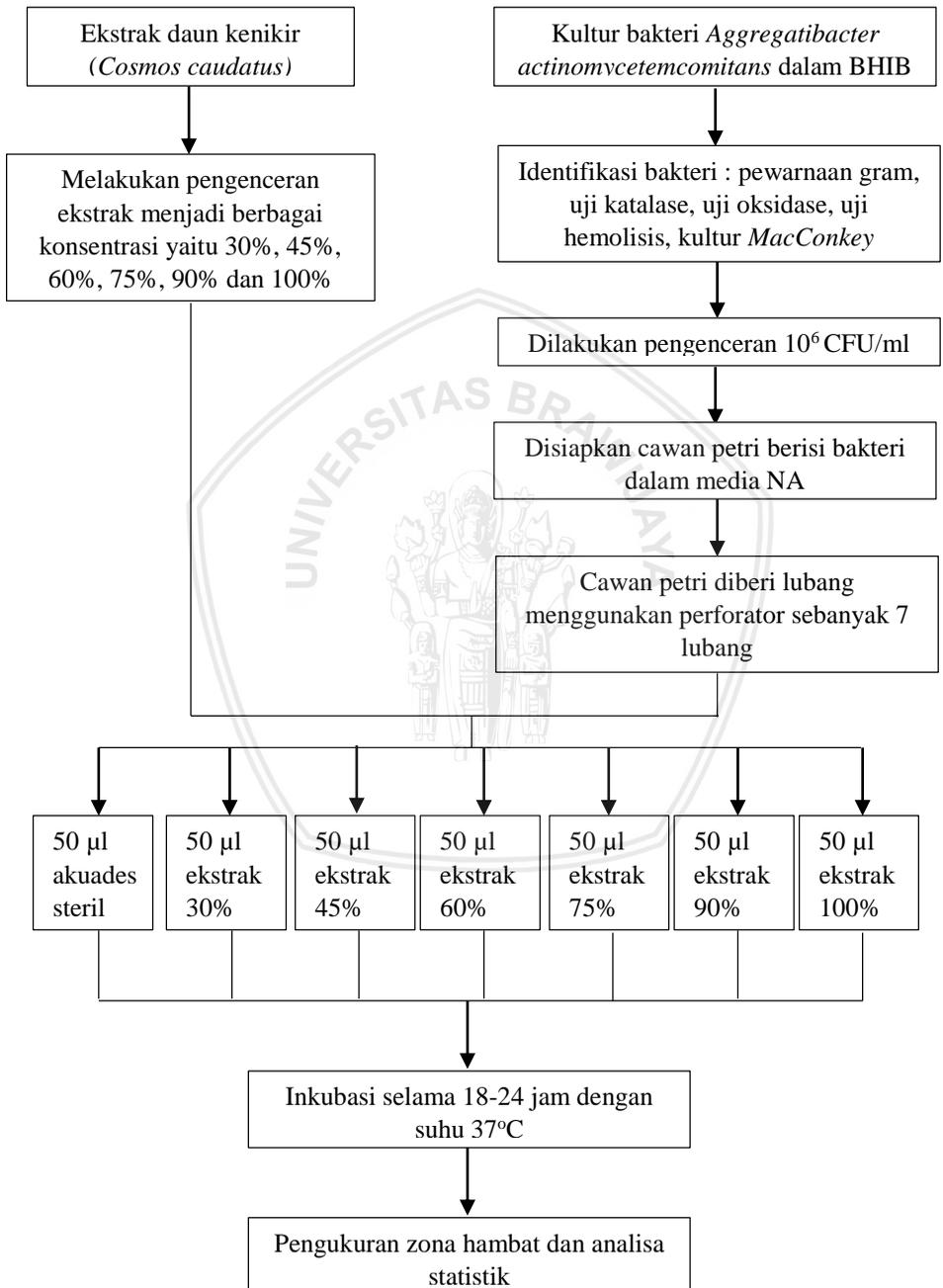
4.6.4 Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

- a. Disiapkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari BHI broth
- b. Disiapkan 4 cawan petri yang berisi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dalam media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)
- c. Pada setiap cawan petri dibagi 7 lubang sumuran dengan diameter 5 mm menggunakan perforator
- d. Masing-masing lubang sumuran diisi dengan ekstrak etanol daun kenikir sebanyak 50 μ l dengan konsentrasi 30% pada lubang pertama, 45% pada lubang kedua, 60% pada lubang ketiga, 75% pada lubang keempat, 90% pada lubang kelima, 100% pada lubang keenam dan akuades steril pada lubang ketujuh

- e. Cawan petri diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C
- f. Zona hambat yang terbentuk dapat diukur menggunakan jangka sorong (Dwiyanti, 2014)



4.7 Skema Prosedur Penelitian



4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dilakukan uji normalitasnya dengan Uji Normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas *Levene*, jika data berdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*, uji *Post Hoc Tukey*, uji korelasi *Pearson* dan uji regresi. Uji *One-Way ANOVA* untuk mengetahui pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Uji *Post Hoc Tukey* untuk melihat perbandingan dua sampel kelompok perlakuan yang memberikan perbedaan signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan signifikan. Uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Uji regresi untuk mengetahui seberapa besar hubungan tersebut (Zahro dan Agustini, 2013).

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

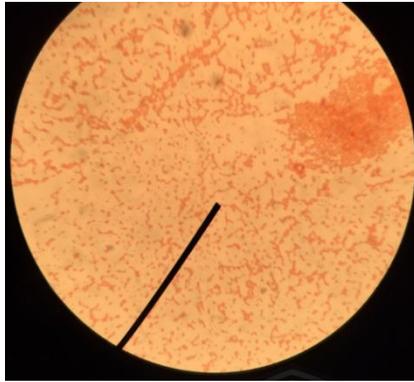
Penelitian ini dilakukan dengan uji identifikasi bakteri terlebih dahulu untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan memenuhi kriteria dari bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Setelah dilakukan uji identifikasi bakteri dilanjutkan dengan penelitian menggunakan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan metode difusi sumuran.

5.1.1 Identifikasi Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Uji identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur. Proses identifikasi terdiri dari uji pewarnaan Gram, uji katalase, uji oksidase, uji hemolisis dan kultur di *MacConkey*.

5.1.1.1 Pewarnaan Gram

Salah satu uji identifikasi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah pewarnaan Gram yang bertujuan untuk mengetahui bakteri tersebut merupakan bakteri Gram positif atau negatif. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan Gram negatif yang ditandai dengan warna merah pada sel bakteri dan berbentuk kokobasil (Cahyani, 2016).



Gambar 5.1 Pewarnaan Gram Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1.1.2 Uji Katalase

Uji katalase pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil positif dengan ditandai terbentuknya gelembung udara setelah koloni bakteri ditetesi H_2O_2 3%. Gelembung udara terjadi karena adanya pemecahan ikatan hidrogen peroksida pada koloni bakteri yang menandakan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* membentuk enzim katalase (Santoso, 2013).



Gambar 5.2 Uji Katalase Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1.1.3 Uji Oksidase

Uji oksidase pada bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bertujuan untuk mengetahui adanya enzim *cytochrome oxidase* pada bakteri yang diuji. Bakteri yang mengandung enzim tersebut dapat mengoksidase reagen sehingga dapat menghasilkan perubahan warna pada kertas reagen. menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terdapat perubahan warna menjadi warna ungu atau ungu tua setelah bakteri digoreskan pada kertas reagen oksidase dalam waktu 10 detik (Syahrurachman, 2009).



Gambar 5.3 Uji Oksidase Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1.1.4 Uji Hemolisis

Uji hemolisis yang dilakukan pada *Blood Agar Plate* (BAP) bertujuan untuk mengetahui sifat hemolisis dari bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Hasil uji hemolisis bakteri

Aggregatibacter actinomycetemcomitans tidak terbentuk zona hemolisis pada media agar (Risqi, 2016).



Gambar 5.4 Uji Hemolisis Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1.1.5 Kultur MacConkey

Kultur *MacConkey* bertujuan untuk membedakan bakteri Gram negatif yang memfermentasi laktosa dan yang tidak. Hasil kultur pada bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada kultur *MacConkey* menunjukkan tidak terjadi perubahan warna pada media atau koloni bakteri yang tumbuh tidak berwarna atau transparan setelah diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam. Dari hasil tersebut bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tidak memfermentasi laktosa (Risqi, 2016).



Gambar 5.5 Kultur MacConkey Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1.2 Pembuatan Kultur Bakteri

Perhitungan kadar densitas bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dilakukan menggunakan metode spektrofotometri menggunakan $\lambda = 625$ nm dengan hasil sebagai berikut:

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 0,584 = 10 \times 0,1$$

$$V1 = 1,71 \text{ ml}$$

Keterangan :

V1 = volume bakteri yang akan dicampurkan dengan NaCl

V2 = volume campuran NaCl dan bakteri

N1 = konsentrasi bakteri

N2 = konsentrasi campuran NaCl dan bakteri

Volume awal NaCl yang ada berjumlah 10 ml kemudian dikurangi sebesar 1,71 ml sehingga menjadi 8,29 ml. Selanjutnya 1,71 ml dari bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang telah dibiakkan ditambahkan ke dalam tabung yang berisi 8,29 ml NaCl. Kemudian diinkubasi secara aerob selama 24 jam pada suhu 37°C.

5.1.3 Hasil Ekstraksi Daun Kenikir

Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dibuat di UPT Materia Medica Batu, Kota Batu, Jawa Timur sebanyak 105 ml menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Hasil ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) berwarna hijau tua dan keruh.

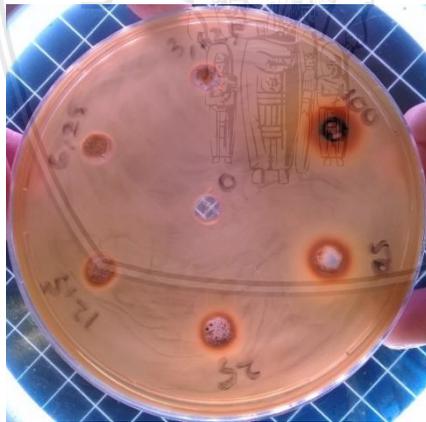


Gambar 5.6 Hasil Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*)

5.1.4 Hasil Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan menggunakan metode difusi sumuran dengan media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*).

Penelitian pendahuluan menggunakan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 0%. Masa inkubasi selama 18-24 jam menghasilkan zona hambat yang berupa zona bening disekitar lubang tidak dapat terlihat dan sulit dilakukan perhitungan dikarenakan ekstrak yang keruh dan bewarna gelap dan juga warna media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) yang kecoklatan. Media diganti menggunakan NA (*Nutrient Agar*) dengan menggunakan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 0%. Hasil yang terlihat pada media NA (*Nutrient Agar*) dapat terlihat zona bening yang terbentuk disekitar lubang dan dapat dilakukan perhitungan. Kemudian dilakukan penelitian dengan menggunakan konsentrasi 0%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90% dan 100% dengan menggunakan media NA (*Nutrient Agar*) dan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.



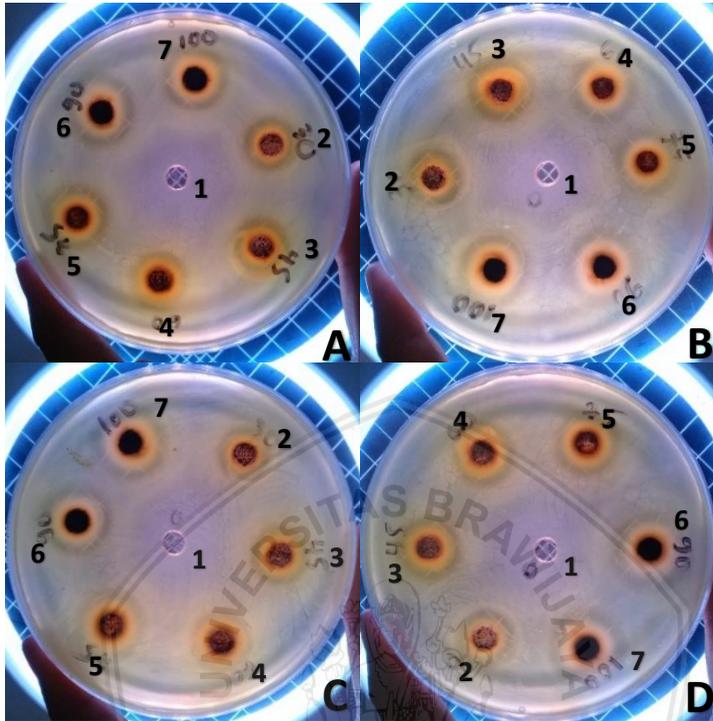
Gambar 5.7 Penelitian Pendahuluan Difusi Sumuran dengan Media BHIA



Gambar 5.8 Penelitian Pendahuluan Difusi Sumuran dengan Media NA

5.1.5 Hasil Difusi Sumuran

Penentuan pemberian ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran. Perbedaan daya antibakteri ditentukan dengan besar diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk pada medium NA (*Nutrient Agar*) yang telah dicampur dengan isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Zona hambat yang dihasilkan merupakan zona bening berbentuk lingkaran yang terbentuk disekeliling lubang yang sudah ditetesi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm. Konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang digunakan adalah 0%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90% dan 100%.



Gambar 5.9 Hasil Pengulangan Difusi Sumuran dengan Media NA

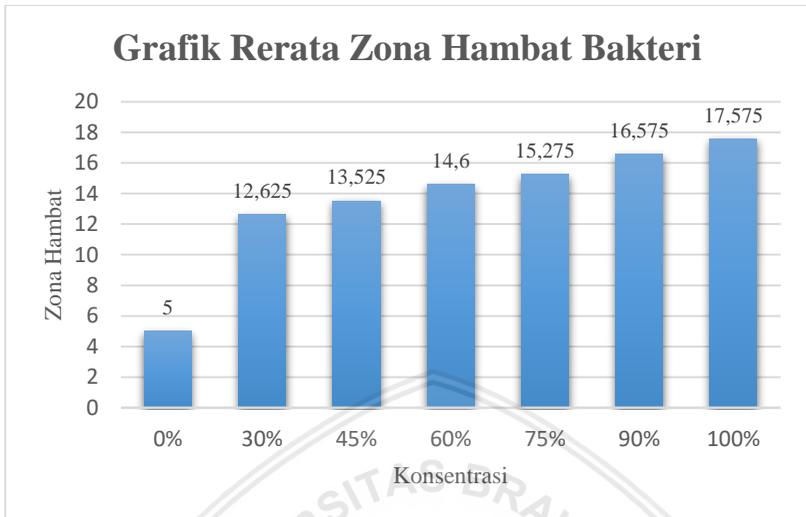
Keterangan gambar:

- 1 : konsentrasi ekstrak daun kenikir 0% dengan rerata zona hambat 5 mm
 - 2 : konsentrasi ekstrak daun kenikir 30% dengan rerata zona hambat 12,625 mm
 - 3 : konsentrasi ekstrak daun kenikir 45% dengan rerata zona hambat 13,525 mm
 - 4 : konsentrasi ekstrak daun kenikir 60% dengan rerata zona hambat 14,6 mm
 - 5 : konsentrasi ekstrak daun kenikir 75% dengan rerata zona hambat 15,275 mm
 - 6 : konsentrasi ekstrak daun kenikir 90% dengan rerata zona hambat 16, 575 mm
 - 7 : konsentrasi ekstrak daun kenikir 100% dengan rerata zona hambat 17,575 mm
- A : pengulangan difusi sumuran I
 B : pengulangan difusi sumuran II
 C : pengulangan difusi sumuran III
 D : pengulangan difusi sumuran IV

Dari hasil difusi sumuran pada gambar menunjukkan adanya variasi ukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37° C. Zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi memiliki rata-rata diameter yang berbeda. Secara umum, terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang diberikan semakin besar zona hambat yang terbentuk. Hasil perhitungan zona hambat ekstrak daun kenikir disajikan dalam Tabel 5.1

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Konsentrasi Ekstrak (%)	Zona Hambat Ekstrak Daun Kenikir (mm)			
	I	II	III	IV
0%	5 mm	5 mm	5 mm	5 mm
30%	12,3 mm	12,9 mm	12,5 mm	12,8 mm
45%	13,2 mm	13,8 mm	13,6 mm	13,5 mm
60%	14 mm	14,6 mm	15,4 mm	14,4 mm
75%	15,2 mm	15 mm	15,9 mm	15 mm
90%	16,4 mm	16,2 mm	16,5 mm	17,2 mm
100%	17,3 mm	17,3 mm	17,6 mm	18,1 mm



Gambar 5.10 Grafik Rerata Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*)

Berdasarkan tabel 5.1 dan gambar 5.10 terdapat perbedaan rerata diameter zona hambatan yang menunjukkan adanya perbedaan daya antibakteri masing-masing konsentrasi. Kelompok kontrol negatif dengan konsentrasi 0% tidak menunjukkan zona bening, hal ini menunjukkan aquades tidak mempunyai daya antibakteri. Konsentrasi 100% menunjukkan zona hambatan yang terbesar dengan rerata 18,1 mm, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir 100% memiliki daya antibakteri yang besar. Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan konsentrasi 30%, 45%, 60%, 75%, dan 90% menghasilkan zona hambatan yang menunjukkan ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi tersebut memiliki daya antibakteri untuk

menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

5.2 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji statistik diperoleh berdasarkan hasil perhitungan zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Uji statistik yang digunakan yaitu uji statistik *One-Way ANOVA*, uji *Post Hoc Tukey*, uji korelasi *Pearson*, dan uji *regresi*. Sebelum dilakukan uji statistik tersebut data harus berdistribusi normal.

5.2.1 Hasil Pengujian Normalitas Data

Data hasil perhitungan diuji dengan uji normalitas sebagai syarat untuk melakukan uji *One-way ANOVA*. Untuk menguji apakah sampel penelitian merupakan jenis sampel dengan distribusi normal maka digunakan uji *Shapiro-Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel.

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Jumlah Sampel	Nilai Signifikansi
28	0,105

Tabel 5.2 menunjukkan nilai zona hambat signifikansi adalah 0,105 ($p > 0,05$), sehingga didapatkan bahwa data rerata zona hambat pertumbuhan bakteri berdistribusi normal. Setelah dilakukan uji normalitas kemudian dilakukan uji homogenitas varians data menggunakan uji *Levene* untuk mengetahui sampel merupakan sampel yang homogen atau tidak.

Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas *Levene*

Jumlah Sampel	Nilai Signifikansi
28	0,238

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa nilai signifikansi adalah 0,238 ($p > 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa data diameter zona hambat bersifat homogen.

5.2.2 Hasil Uji *One-Way ANOVA*

Uji *One-Way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui perbedaan pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun kenikir terhadap rerata diameter zona hambat.

Tabel 5.4 Hasil Uji *One-Way ANOVA*

Jumlah Sampel	Nilai Signifikansi
28	0,000

Tabel 5.4 menunjukkan hasil uji *One-Way ANOVA* dengan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara ketujuh kelompok perlakuan, yaitu antara konsentrasi ekstrak daun kenikir 0%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90%, dan 100% terhadap rerata diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

5.2.3 Hasil Uji *Post Hoc Tukey*

Uji *Post Hoc Tukey* digunakan untuk membandingkan dua sampel yang memberikan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) dan tidak memberikan perbedaan signifikan.

Tabel 5.5 Hasil Uji Post Hoc Tukey

Konsentrasi	0%	30%	45%	60%	75%	90%	100%
0%		-7,625*	-8,525*	-9,600*	-10,275*	-11,575*	-12,575*
30%	7,625*		-0,900*	-1,975*	-2,650*	-3,950*	-4,950*
45%	8,525*	0,900*		-1,075*	-1,750*	-3,050*	-4,050*
60%	9,600*	1,975*	1,075*		-0,675	-1,975*	-2,975*
75%	10,275*	2,650*	1,750*	0,675		-1,300*	-2,300*
90%	11,575*	3,950*	3,050*	1,975*	1,300*		-1,000*
100%	12,575*	4,950*	4,050*	2,975*	2,300*	1,000*	

Ket: tanda (*) adalah terdapat perbedaan signifikan

Tabel 5.5 menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) dengan konsentrasi 0%, 30%, 45%, 90% dan 100% memiliki perbedaan signifikan terhadap semua konsentrasi. Pada konsentrasi 75% terdapat perbedaan tidak signifikan dengan konsentrasi 60%.

5.2.4 Hasil Uji Korelasi Pearson

Uji korelasi *Pearson* bertujuan untuk mengetahui hubungan dari pemberian ekstrak daun kenikir dengan berbagai konsentrasi terhadap besarnya zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Berdasarkan hasil uji korelasi *Pearson* didapatkan korelasi yang signifikan antara pemberian ekstrak daun kenikir terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan nilai korelasi sebesar 0,934 dan nilai signifikansi sebesar 0,000. Kekuatan korelasi adalah kuat dengan arah korelasi positif karena nilai korelasi positif. Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun kenikir

cenderung akan memperbesar diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

5.2.5 Hasil Uji Regresi

Uji regresi dilakukan untuk mengetahui besar distribusi konsentrasi ekstrak daun kenikir terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Hasil dari uji regresi didapatkan nilai R square (R^2) sebesar 0,873 yang menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak daun kenikir terhadap terbentuknya zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebesar 87,3%.

Hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak dengan besarnya zona hambat dapat dinyatakan dengan rumus $y = 7,261 + 0,111x$. Dengan y merupakan interval zona hambat dan x merupakan konsentrasi ekstrak daun kenikir. Hal ini menunjukkan hubungan konsentrasi terhadap pembentukan zona hambat positif dengan semakin besar konsentrasi maka semakin besar zona hambat bakteri yang terbentuk.



BAB VI

PEMBAHASAN

Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang dibuat dengan konsentrasi 100% mendapatkan rata-rata zona hambat terbesar sebesar 17,575 mm, pada konsentrasi 90% sebesar 16,575 mm, pada konsentrasi 75% sebesar 15,275 mm, pada konsentrasi 60% sebesar 14,6 mm, pada konsentrasi 45% sebesar 13,525 mm, pada konsentrasi 30% sebesar 12,625 mm dan pada konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif sebesar 5 mm karena tidak terbentuk zona bening disekitar lubang sehingga ukuran diameternya sebesar lubang sumuran yang dibentuk yaitu 5 mm. Besar konsentrasi ekstrak daun kenikir memberikan pengaruh terhadap besar diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang terbentuk.

Berdasarkan hasil uji statistik *One-Way ANOVA* didapatkan hasil bahwa ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) memiliki efek yang signifikan dalam menghambat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro* dengan metode difusi sumuran. Hal ini disebabkan adanya senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*). Pada penelitian Dwiyanti dkk (2014), dari hasil studi fitokimia daun kenikir yang diekstrak menggunakan etanol dan pelarut lainnya, menunjukkan adanya senyawa aktif flavonoid, terpenoid, saponin, tanin, alkaloid dan minyak atsiri yang berpotensi sebagai antibakteri.

Flavonoid berfungsi untuk mengganggu sintesis dinding sel bakteri sehingga terjadi kebocoran plasma yang diakhiri dengan lisisnya bakteri. Flavonoid juga berfungsi untuk menghambat DNA gyrase dan menghambat aktivitas enzim ATPase bakteri (Dewi dkk., 2013). Harborne (2006) dalam Astutiningrum (2015) menyebutkan bahwa senyawa saponin mirip seperti detergen yang merupakan senyawa polar sehingga saponin akan menurunkan tegangan permukaan. Hal ini akan menyebabkan membran sel bakteri terganggu karena lapisan hidrofob dan hidrofilik bercampur sehingga akan mengganggu kelangsungan hidup bakteri karena terjadi pecahnya membran sel. Toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, mekanisme kerja senyawa tanin dalam menghambat sel bakteri yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri, menghambat fungsi selaput sel (transport zat dari sel satu ke sel yang lain) dan menghambat sintesis asam nukleat sehingga pertumbuhan bakteri dapat terhambat. Tanin dapat membentuk kompleks dengan protein dan interaksi hidrofobik, jika terbentuk ikatan hydrogen antara tanin dengan protein enzim yang terdapat pada bakteri maka kemungkinan akan terdenaturasi sehingga metabolisme bakteri terganggu, selain itu dengan adanya tanin maka akan terjadi penghambatan metabolisme sel, mengganggu sintesa dinding sel dan protein dengan mengganggu aktivitas enzim (Rozlizawaty dkk., 2013). Alkaloid adalah senyawa yang memiliki mekanisme menghambat bakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Njeru *et al.*, 2013).

Hasil dari uji *Post Hoc Tukey* pada konsentrasi 0% menunjukkan perbedaan signifikan dengan semua konsentrasi yaitu 30%, 45%, 60%, 75%, 90% dan 100%. Konsentrasi 30% juga menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan semua konsentrasi yaitu 0%, 45%, 60%, 75%, 90% dan 100%. Pada konsentrasi 45% menunjukkan perbedaan signifikan terhadap semua konsentrasi yaitu 0%, 30%, 60%, 75%, 90% dan 100%. Konsentrasi 90% menunjukkan perbedaan signifikan pada semua konsentrasi yaitu 0%, 30%, 45%, 60%, 75% dan 100%. Konsentrasi 100% menunjukkan perbedaan signifikan pada semua konsentrasi yaitu 0%, 30%, 45%, 60%, 75% dan 90%. Konsentrasi 60% menunjukkan perbedaan signifikan pada konsentrasi 0%, 30%, 45%, 90%, 100% dan menunjukkan perbedaan tidak signifikan pada konsentrasi 75%. Konsentrasi 75% menunjukkan perbedaan signifikan pada konsentrasi 0%, 30%, 45%, 90%, 100% dan menunjukkan perbedaan tidak signifikan pada konsentrasi 60%. Perbedaan yang tidak signifikan pada konsentrasi 60% dan 75% dapat disebabkan oleh senyawa isokuerstrin yang merupakan golongan flavonoid yang menunjukkan adanya zona hambat pada bakteri (Chotiah dkk., 2015). Kandungan senyawa isokuerstrin pada konsentrasi 60% dan 75% kemungkinan tidak jauh berbeda. Struktur dinding sel dari bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* juga dapat menentukan penetrasi, ikatan dan aktivitas senyawa antibakteri dari daun kenikir (*Cosmos caudatus*). Lipopolisakarida yang terkandung pada membran luar bakteri yang mampu untuk memperkuat sel bakteri dari lingkungan luar. Pada membran ini terdapat porin yang berfungsi untuk mengatur akses

larutan ke membran sitoplasma (Samaranayake, 2012). Membran luar pada bakteri menyebabkan permukaan bakteri menjadi hidrofilik sehingga bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan resisten terhadap antibiotik yang bersifat hidrofobik. Pola resistensi bakteri tersebut juga diketahui dapat terjadi akibat penutupan celah/pori pada dinding sel sehingga menurunkan jumlah agen antibakteri yang melalui membran sel. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* juga memperlihatkan peningkatan aktivitas pompa keluar (*efflux pumps*) yang menyebabkan agen antibakteri tidak dapat berinteraksi dengan tempat target (Afrina dkk., 2016). Dalam penelitian Dewi dkk. (2013) dijelaskan apabila tidak ada perbedaan yang signifikan pada konsentrasi yang berbeda dapat dijelaskan dengan teori bifasik. Teori bifasik atau *hormesis* adalah efek yang terjadi karena suatu zat dapat memiliki fase peningkatan dan penurunan. Hubungan respon dosis yang terjadi adalah meningkatnya respon pada dosis rendah, tetapi menunjukkan respon penghambatan pada dosis yang lebih tinggi.

Hasil uji korelasi menunjukkan nilai korelasi positif yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) cenderung akan memperbesar diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Hasil dari uji regresi menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak daun kenikir terhadap terbentuknya zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebesar 87,3%. Sisa dari nilai tersebut sebesar 12,7% dapat disebabkan oleh beberapa faktor yang tidak teliti. Beberapa faktor

tersebut seperti penyimpanan ekstrak yang terlalu lama, tempat penyimpanan ekstrak tidak sesuai, dan peralatan yang digunakan kurang steril. Dapat juga disebabkan pengukuran diameter zona hambat kurang teliti.

Menurut Lakitan (2013) dalam Astutiningrum (2015), potensi paling besar metabolit sekunder berada pada bagian tumbuhan yang sudah tua. Metabolit sekunder berfungsi untuk melindungi tumbuhan dari berbagai serangan bakteri, jamur dan jenis pathogen lainnya. Pemilihan usia daun yang digunakan mempengaruhi terlarutnya senyawa aktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Ekstrak daun kenikir menggunakan daun kenikir yang masih muda yang biasa dikonsumsi oleh masyarakat sehingga masyarakat akan lebih mudah menggunakan daun yang muda untuk dijadikan obat dibandingkan daun yang sudah tua (Astutiningrum, 2015).

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* seiring dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan. Hal ini diakibatkan karena semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kenikir, maka jumlah zat antibakteri yang terlarut juga semakin banyak sehingga daya hambat terhadap bakteri semakin tinggi (Pelczar dan Chan (1986) dalam Dwiyanti dkk., 2014). Menurut Davis dan Stout (1971) dalam Jannata (2014), klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri yang dilihat berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk terdiri atas 4 kelompok yaitu respon lemah dengan diameter ≤ 5 mm, sedang dengan diameter 5-10 mm, kuat dengan diameter 10-20 mm dan sangat kuat dengan

diameter ≥ 20 mm. Berdasarkan klasifikasi tersebut didapatkan hasil bahwa semua konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan kategori kuat. Dengan demikian ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) memiliki potensi sebagai antibakteri.

Berdasarkan hasil uji statistik yang mempunyai nilai kemaknaan yang tinggi, maka dapat dikatakan bahwa ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Hal ini membuktikan hipotesis penelitian yang menyatakan bahwa ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) mempunyai efek antibakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro* dapat diterima.

Keterbatasan dari penelitian ini adalah penelitian ini hanya menggunakan satu metode yaitu metode difusi sumuran. Metode difusi sumuran digunakan untuk melihat zona hambat pertumbuhan bakteri sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut baik *in vitro* maupun *in vivo* untuk mengetahui dosis efektif, toksisitas dan efek samping yang dihasilkan oleh ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebelum kedepannya dapat menjadi dasar aplikasi klinis pada manusia. Keterbatasan lainnya adalah tidak ada penelitian untuk mengetahui persentase kandungan senyawa aktif dalam ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) efektif sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*
- b. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) maka semakin luas diameter zona hambat yang terbentuk terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- c. Konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang menghasilkan zona hambat yang paling besar adalah konsentrasi 100%

7.2 Saran

- a. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai antimikroba terhadap mikroorganisme lain selain bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai presentase kandungan bahan aktif dalam ekstrak daun

kenikir (*Cosmos caudatus*) yang memiliki aktivitas antibakteri.

- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui untuk mengetahui dosis efektif, toksisitas dan efek samping yang dihasilkan oleh ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) sebelum kedepannya dapat menjadi dasar aplikasi klinis pada manusia.



DAFTAR PUSTAKA

- Afrina, Chismirina, S., Aulia C.R.P. 2016. *Konsentrasi Hambat dan Bunuh Minimum Ekstrak Buah Kapulaga (Amomum compactum) terhadap Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Journal of Syiah Kuala Dentistry Society. Vol 1(2): 192-200.
- Astutiningrum, T. 2016. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kenikir (Cosmos caudatus) terhadap Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Skripsi. Universitas Sanata Dharma Yogyakarta. 30-39.
- Azwanida, N.N. 2015. *A Review on the Extraction Methods Use in Medical Plants, Principle Strength and Limitation*. Medicinal & Aromatic Plants. Vol 4 (3): 1-6.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K. 2016. *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. Journal of Pharmaceutical Analysis. Vol 6. 71-79.
- Bunawan, H., Baharum, S.N., Bunawan, S.N., Amin, N.M., Noor, N.M. 2014. *Cosmos caudatus Kunth: A Traditional Medicinal Herb*. Global Journal of Pharmacology. Vol 8 (3): 420-426.
- Cahyani, D.P. 2013. *Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) terhadap Perbaikan Sel Epitel Gingiva Tikus Putih Galur Wistas (Rattus Novergicus) yang Diinduksi Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 30-36
- Chotiah, S., Trisharyanti, I., Munawaroh, R. 2015. *Ekstrak Etanol Daun Kenikir (Cosmos caudatus. (L.) H.B.K) sebagai Antibakteri terhadap Streptococcus mutans dan Staphylococcus epidermidis*. Naskah Publikasi. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 1-7.
- Da Costa, L.F.N.P., Amaral, C.D.S.F., Barbirato, D.D.S., Leao, A.T.T., Fogacci, M.F. 2017. *Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in Chronic Periodontitis: A meta-analysis*. The Journal of the American Dental Association. Vol 148 (5): 308-318.

- Darma, P.F. 2014. *Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Daun Wani (Mangifera caesia) pada Mencit yang Diinduksi Streptozotocin*. Skripsi. Universitas Atmajaya Yogyakarta. 21-22.
- Dewi, I.K., Joharman, Budarti, L.Y. 2013. *Perbandingan Daya Hambat Ekstrak Etanol dengan Sediaan Sirup Herbal Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) terhadap Pertumbuhan Shigella dysenteriae In Vitro*. Berkala Kedokteran. Vol 9 (2): 191-198.
- Dukic, D., Maskovic, P., Moracanin, S.V., Kurcubic, V., Milijasevic, M., Babic, J. 2017. *Conventional and unconventional extraction methods applied to the plant, Thymus serpyllum L.* IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Vol 85. 1-6.
- Dwiyanti, W., Ibrahim, M., Trimulyono, G. 2014. *Pengaruh Ekstrak Daun Kenikir (Cosmos caudatus) terhadap Pertumbuhan Bakteri Bacillus cereus secara In Vitro*. Lentera Bio. Vol 3 (1): 1-5.
- Fidary, H., dan Lessang, R. 2008. *Periodontitis Agresif; Karakter dan Perawatannya*. MKG. 15(2): 187-188.
- Hakim, M.A.R., Suhartanto, M.R. 2015. *Penentuan Masak Fisiologi dan Ketahanan Benih Kenikir (Cosmos caudatus Kunth) terhadap Desikasi*. J. Hort. Indonesia. Vol 6 (2): 84-90.
- Hidayat, S., Romade, Naputitupulu. 2015. *Kitab Tumbuhan Obat*. Penebar Swadaya. Edisi 1. 217-218.
- Hidayat, S., Wahyuni, S., Andalusia, S. 2008. *Seri Tumbuhan Obat Berpotensi Hias*. Gramedia. Edisi 1. 50-57.
- Jannata, R.H., Gunadi, A., Ermawati, T. 2014. *Daya Antibakteri Ekstrak Kulit Apel Manalagi (Malus sylvestris Mill.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus mutans*. e-Jurnal Pustaka Kesehatan. Vol 2 (1): 23-28.
- Johansson, A. 2011. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host inflammatory response*. Toxins (Basel). Vol 3 (3): 242-259.
- Joshipura, V., Yadalam, U., Brahmavar, B. 2015. *Aggressive periodontitis: A review*. Journal of the International Clinical Dental Research Organization. Vol 7 (1): 11-17.

- Karimy, M.F., Julendra, H., Hayati, S.N., Sofyan, A., Damayanti, E., Priyowidodo, D. 2013. *Efektifitas Ekstrak Daun Kenikir (Cosmos caudatus), Daun Mengkudu (Morinda citrifolia) dan Tepung Cacing Tanah (Lumbricus rubellus) dalam Sediaan Granul Larut Air sebagai Koksidiostat Alami*. JITV. 18 (2): 88-98.
- Kler, D.S., Malik, D.R. 2010. *An Update on The Virulence Factors of Actinobacillus Actinomycetemcomitans – A Systematic Review*. Research & Reviews: A Journal Of Dentistry. 1(10): 1-10.
- Mc Donald, R.E., Avery, D.R., Dean, J.A. 2011. *Dentistry for the Child and Adolescent*. 9th ed. Philadelphia: Mosby Inc. 381-382.
- Mukhriani. 2014. *Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif*. Jurnal Kesehatan. Vol 7 (2): 361-367.
- Mythireyi, D., Krishnababa, M.G. 2012. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans, an Aggressive Oral Bacteria – A review*. International Journal of Health Sciences and Research. Vol 2 (5): 105-117.
- Newman, M.G., Takei, H.H., Klokkevold, P.R., Carranza, F.A. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology*. 12th ed. California: W.B Saunders Company. 219-240.
- Njeru, S.N., Josphat, M., Mwaniki, C.G., Mwendia, C.M., George, K.K. 2013. *A review of Some Phytochemicals Commonly Found In Medicinal Plants*. International Journal of Medicinal Plants. 135-140
- Norskov – Lauritsen, N., Kilian, M. 2006. *Reclassification Of Actinobacillus actinomycetemcomitans , Haemophilus aphrophilus , Haemophilus paraaphrophilus , Haemophilus segnis As Aggregatibacter actinomycetemcomitans Gen . Nov ., Comb . Nov ., Aggregatibacter aphrophilus Comb .Nov And Aggregatibacter segnis Comb . Nov And Emended Description Of Aggregatibacter aphrophilus To Include V Factor - Dependant And V – Factor Independent Isolates*. Int J Syst Evol Microbiol. 56 : 2135 -2146.
- Paino, A. 2013. *Virulence Properties of Aggregatibacter actinomycetemcomitans Biofilm and Characterisation of Its Putative Cytokine Exploitation*. In: Pussinen DP, ed. Helsinki, Finland: Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology. Institute of Dentistry University of Helsinki. 12-18

- Pratiwi. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga Medical Series. Jakarta. Edisi 1. 176.
- 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 dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta. 5-11.
- Rasdi, N.H.M., Samah, O.A., Sule, A., Ahmed, Q.U. 2010. *Antimicrobial Studies of Cosmos caudatus Kunth (Compositae)*. Journal of Medicinal Plants Research. Vol 4 (8): 669-673.
- Ricki. 2011. *Penentuan Komponen Senyawa/Minyak Atsiri dan Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksana, Etil Asetat dan Metanol Kulit Kayu Manis (Cinnamomum burmanii)*. Skripsi. Program Studi Sarjana Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara. 5-17.
- Risqi, F. 2016. *Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Alpukat (Persea Americana Mill) terhadap Aggregatibacter actinomycetemcomitans Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 28-42.
- Roslizawaty, Ramadani, N.Y., Fakhurrrazi, Herrialfian. 2013. *Aktivitas Antibakterial Ekstrak Etanol dan Rebusan Sarang Semut (Myrmecodia sp.) terhadap Bakteri Escherichia coli*. Jurnal Medika Venetaria. Vol 7 (2): 91-94.
- Sharifi, N., Mahernia, S., Amanlou, M. 2017. *Comparison of Different Methods in Quercetin Extraction from Leaves of Raphanus sativus L*. Pharmaceutical Sciences. Vol 23. 59-65.
- Sharifuldin. 2014. *Profiling and Quantification of Cosmos caudatus Kunth and Centella Asiatica Linn. and In Vitro Anti Cancer Activity of Cosmos caudatus*. Thesis. 7-11.
- Samaranayake, L. 2012. *Essential Microbiology for Dentistry*. 4th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier. 80-142.
- Santoso, D.O.S.P. 2013. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) terhadap Jumlah Sel Neutrofil pada Gingiva Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. 25-30.

- Setiawatie, E.M. 2012. *Crude toxin of Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotype-B increase PARP-1 expression in gingival epithelium*. Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). Vol 45 (1): 39-42.
- Sriraman, P., Mohanraj, R., Neelakantan, P. 2014. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans in Periodontal Disease*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. Vol 5 (2): 406-419.
- Syahrurachman, A. 2009. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Jakarta. 429 hlm.
- Tenggara, F.S., Rizka, Y., Parisihni, K. 2014. *Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (Annona muricata, Linn) terhadap Pertumbuhan Bakteri Mixed periodontopatogen*. Denta Jurnal Kedokteran Gigi. Vol 8 (2): 1-9.
- Vaishnani, J. 2009. *Superantigen*. Indian J Dermatol Venereol Leprol. Vol 75 (5): 540-544.
- Widjaja, H. 2011. *Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Aktivitas Fagositosis Makrofag dan Kadar Vitamin C dalam Cairan Intraperitoneal Mencit BALB/C dengan Sepsis*. Thesis. Universitas Diponegoro Semarang. 6-13.
- Widyawati, T., Aulanni'am, Oktavianie, D.A. 2014. *Pengaruh Induksi Lipopolisakarida (LPS) terhadap Profil Protein dan Aktivitas Enzim Protease pada Otak Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. 1-9.
- Yusoff, N.A.H., Noor, N.F., Rukayadi, Y. 2015. *Effects of Cosmos caudatus Kunth. (Ulam raja) Extract on Microflora in Raw Chicken Meat*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Vol 4 (2): 426-435.
- Zahro, L., Agustini, R. 2013. *Uji Efektifitas Antibakteri Ekstrak Kasar Saponin Jamur Tiram Putih (Pleurotus ostreatus) terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli*. UNESA Journal of Chemistry. Vol 2 (3): 120-129.