

**SKRIPSI
SEBAGAI SALAH SATU SYARAT UNTUK MEMPEROLEH
GELAR SARJANA KEDOKTERAN GIGI**

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING
WULUH (*Averrhoa bilimbi*) SEBAGAI ANTIBAKTERI
TERHADAP *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
PEMBENTUK BIOFILM SECARA *IN VITRO***



**oleh :
FRANKLYN CRISTEVAN NICOLAS
145070400111009**

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

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai Antibakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Pembentuk Biofilm secara *In Vitro*

oleh:

Franklyn Cristevan Nicolas
145070400111009

Telah diujikan di depan Majelis Penguji pada tanggal 06 Juni 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
dalam Bidang Kedokteran Gigi

Menyetujui:

Pembimbing I

Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK (K)
NIP. 195011101980021001

Pembimbing II

drg Viranda Sutanti, M. Si
NIP. 198408272018032001

Mengetahui:

Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya



PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah skripsi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh 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 dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah disertasi 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, 30 Mei 2018
Yang menyatakan,

Franklyn Cristevan Nicolas
NIM 145070400111009

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Proposal Skripsi dengan judul “Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai Antibakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Pembentuk Biofilm secara *In Vitro*”.

Dalam penulisan proposal skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Dengan selesainya proposal skripsi ini, penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. drg. R. Setyohadi, MS selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
2. drg. Kartika Andari Wulan, Sp.Pros selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
3. Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS,DMM.,Sp.MK(K) sebagai dosen pembimbing pertama yang dengan sabar membimbing dan senantiasa memberi saran dan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi ini.
4. drg. Viranda Sutanti, M.Si sebagai dosen pembimbing kedua yang dengan sabar membimbing dan senantiasa memberi saran dan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi ini.
5. Segenap anggota Tim Pengelola Skripsi.
6. Orangtua penulis yang selalu memberikan semangat dan doa yang berlimpah kepada penulis.
7. Teman terdekat penulis, Hirvinda Giovanni Sucipto yang selalu memberikan semangat, doa, dan dukungan kepada penulis.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga proposal skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 30 Mei 2018
Penulis

ABSTRAK

Franklyn C. Nicolas, NIM: 145070400111009, Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang, 30 Mei 2018, “**Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai Antibakteri terhadap *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* Pembentuk Biofilm secara In Vitro”.**

Tim Pembimbing: (1) Prof.Dr.dr. Noorhamdani AS, DMM.,Sp.MK(K). (2) drg. Viranda Sutanti, M.Si.

Periodontitis agresif merupakan penyakit pada jaringan penyangga gigi yang memiliki karakteristik berupa kerusakan ligamen periodontal dan tulang alveolar yang cepat. Bakteri yang berperan penting dalam menyebabkan periodontitis agresif adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm secara *in vitro*. Ekstraksi daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) mengandung zat aktif yang mempunyai efek antibakteri yaitu flavonoid, saponin, dan tannin. Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* dengan metode difusi sumuran, yang digunakan adalah konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) 12,5%, 25%, 50%, 70%, dan 100%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak 25% sudah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan terbentuknya zona hambat pertumbuhan bakteri pada media *Nutrient agar* (NA) dengan respon hambat lemah. Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji statistik *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) dan uji korelasi-regresi. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan efek antibakteri yang signifikan pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serta terdapat hubungan yang kuat antara pemberian ekstrak etanol daun

belimbing wuluh dengan pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($p<0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm secara *in vitro* dengan kadar hambat minimum pada konsentrasi 25%.

Kata Kunci : Periodontitis agresif, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*), antibakteri.

ABSTRACT

Franklyn C. Nicolas, NIM: 145070400111009, Dentist Education Studies Program Faculty of Dentistry, Brawijaya University, Malang, 30 Mei 2018, **“Effectiveness of Ethanol Extract of Bilimbi Leaves (*Averrhoa bilimbi*) as Antibacterial Against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* which Form biofilm in Vitro”.**

Supervisor: (1) Prof.Dr.dr. Noorhamdani AS, DMM., Sp.MK (K). (2) drg. Viranda Sutanti, M.Si.

Aggressive Periodontitis is a disease of dental supporting tissue which has characteristic such as rapid periodontal ligament and alveolar bone damage. The bacteria that play an important role in causing aggressive periodontitis is *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The purpose of this research was to determine the effect of ethanol extract of bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) leaves as an antibacterial against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* *in vitro*. The extraction of bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) leaves used maceration method with 70% ethanol as the solvent. bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) leaves contain active substances that have antibacterial effect such as flavonoids, saponins and tannins. This research is using true experimental design with well diffusion method, and using 12,5%, 25%, 50%, 70%, and 100% concentration of ethanol extract of bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) leaves. The result showed that the extract concentration of 25% was able to inhibit the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* colonies growth with the formation of inhibition zone of bacterial growth on Nutrient Agar (NA) media which indicate a weak inhibitory response. The data analysis used One-Way Analysis of Variance (ANOVA) and correlation-regression test. The statistical analysis showed that there were significant differences of antibacterial effect on each concentration of ethanol extract of bilimbi leaves to the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* colonies growth and also there was a strong relation between the ethanol extract of bilimbi leaves and the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* colonies growth ($p < 0.05$). The conclusion of this research is that the ethanol extract of bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) leaves effective as antibacterial

against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* which Form biofilm *in vitro* with minimum inhibitory concentration at a concentration of 25%.

Keywords: Aggressive Periodontitis, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Bilimbi (*Averrhoa bilimbi*) leaves, Antibacterial.

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan Skripsi	ii
Pernyataan Orisinalitas Skripsi.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	x
Daftar Gambar	xiii
Daftar Tabel.....	xiv
Daftar Lampiran	xv
Daftar Istilah, Simbol, dan Singkatan	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Jaringan Periodontal	5
2.1.1 Gingiva	5
2.1.2 Sementum	6
2.1.3 Tulang Alveolar.....	6
2.1.4 Ligamen Periodontal.....	6
2.2 Periodontitis	7
2.2.1 Patogenesis Periodontitis	7
2.2.2 Periodontitis Agresif.....	8
2.3 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	9
2.3.1 Taksonomi <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	9
2.3.2 Morfologi <i>Aggregatibacter</i> <i>Actinomycetemcomitans</i>	9
2.3.3 Faktor Virulensi <i>Aggregatibacter</i> <i>Actinomycetemcomitans</i>	10

2.3.4 Karakteristik Biokimia <i>Aggregatibacter</i> <i>Actinomycetemcomitans</i>	11
2.4 Biofilm <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	12
2.5 Uji Identifikasi Bakteri	12
2.5.1 Pewarnaan Gram	12
2.5.2 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri	13
2.5.3 Uji Katalase.....	13
2.5.4 Uji Oksidase.....	14
2.5.5 Uji Hemolisis	14
2.5.6 Uji Agar Mac Conkey.....	15
2.6 Uji Identifikasi Biofilm.....	15
2.6.1 Metode Kultur Jaringan	15
2.6.2 Metode Tabung	16
2.6.3 Metode <i>Congo Red Agar</i>	17
2.7 Uji Kepakaan Antimikroba	
2.7.1 Metode Dilusi.....	17
2.7.2 Metode Difusi.....	18
2.8 Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i>).....	18
2.8.1 Klasifikasi Tumbuhan.....	18
2.8.2 Kandungan Kimia Belimbing Wuluh	19
2.9 Metode Ekstraksi	20
BAB 3 KERANGKA KONSEP	
3.1 Kerangka Konsep	21
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	22
3.3 Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Desain Penelitian	23
4.2 Tempat Penelitian	23
4.3 Sampel Penelitian	23
4.4 Pengulangan Sampel.....	23
4.5 Variabel Penelitian	24
4.5.1 Variabel Bebas	24
4.5.2 Variabel Terikat.....	24
4.6 Definisi Operasional	24
4.7 Alat dan Bahan	25
4.7.1 Simplicia Daun Belimbing Wuluh.....	25
4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh	25

4.7.3 Alat dan Bahan untuk Kultur, Identifikasi Bakteri, dan Uji Efektivitas.....	25
4.8 Prosedur Penelitian	25
4.8.1 Sterilisasi Alat	25
4.8.2 Persiapan Bahan	26
4.8.3 Pembuatan Sediaan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh	26
4.8.4 Identifikasi <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	26
4.8.5 Persiapan Suspensi Uji <i>Aggregatibacter</i> <i>Actinomycetemcomitans</i>	29
4.8.6 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Menggunakan Metode Tube-Test.....	29
4.8.7 Uji Pendahuluan Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i>) terhadap <i>Aggregatibacter</i> <i>actinomycetemcomitans</i> dengan Metode Difusi Sumuran.....	30
4.8.8 Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i>) terhadap <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> dengan Metode Difusi Sumuran.....	30
4.9 Analisis Data	31
4.10 Alur Penelitian.....	32
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Hasil Penelitian.....	33
5.1.1 Hasil Penelitian Pendahuluan	37
5.1.2 Hasil Penelitian Pengulangan	38
5.2 Hasil Analisis Data	40
BAB 6 PEMBAHASAN	42
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	46
7.2 Saran	46
Daftar Pustaka	47
Lampiran	53

DAFTAR GAMBAR

	Hal
2.1 Gambaran mikroskopik <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> perbesaran 400x.....	10
2.2 Tanaman Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i>).....	19
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	21
4.1 Alur Penelitian	32
5.1 Pewarnaan Gram <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ..	34
5.2 Uji Hemolisis <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	34
5.3 Uji Agar MacConkey <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>	35
5.4 Uji Katalase dan Oksidase <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	36
5.5 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	37
5.6 Uji Pendahuluan.....	38
5.7 Hasil Penelitian Pengulangan Perapatan Konsentrasi	39

DAFTAR TABEL

	Hal
2.1 Taksonomi <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	9
2.2 Taksonomi Belimbing Wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i>).....	18
4.1 Klasifikasi Respon Hambat Pertumbuhan Bakteri.....	31
5.1 Hasil Penelitian Pengulangan	38

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1 Determinasi Tanaman Belimbing Wuluh	53
Lampiran 2 Ekstrak Daun Belimbing Wuluh	54
Lampiran 3 Uji Normalitas	55
Lampiran 4 Uji Homogenitas	56
Lampiran 5 Uji <i>One-way</i> ANOVA	57
Lampiran 6 Uji <i>Post Hoc</i>	58
Lampiran 7 Uji Korelasi-Regresi.....	59

DAFTAR ISTILAH, SIMBOL, DAN SINGKATAN

AAP	: <i>American Academy of Periodontology</i>
BaCl2	: Barium klorida
BHIA	: <i>Brain Heart Infusion Agar</i>
CDT	: <i>Cytoclethal Distending Toxins</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
CRA	: <i>Congo Red Agar</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EPS	: <i>Extracellular Polymeric Substance</i>
g	: Gram
H2SO4	: Asam sulfat
HLA	: <i>Human Leucocyte Antigen</i>
KBM	: Kadar Bunuh Minimum
KHM	: Kadar Hambat Minimum
LPN	: Leukosit Polimorfonuklear
mg	: Miligram
ml	: Mililiter
mm	: Milimeter
N2	: Nitrogen
NaCl	: Natrium klorida
OD	: <i>Optical density</i>
PGE2	: Prostaglandin E2
pH	: <i>Potential of Hydrogen</i>
RTX	: <i>Repeats in Toxin</i>
SAM	: <i>Surface-associated Material</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TSB	: <i>Trypticase Soy Broth</i>
SPSS	: <i>Statistical Product of Service Solution</i>
UPT	: Unit Pelaksana Teknis
α	: Alfa
β	: Beta
λ	: Lamda
μl	: mikroliter

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Periodontitis merupakan penyakit jaringan periodontal dan menjadi salah satu penyakit dengan tingkat penyebaran yang luas di masyarakat. Angka kejadian periodontitis bervariasi di berbagai daerah dan memperlihatkan kecenderungan terjadinya peningkatan (Lely, 2004). Prevalensi nasional masalah gigi dan mulut di Indonesia menurut data laporan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2007 adalah 23,4% sedangkan pada tahun 2013 prevalensi nasional meningkat hingga 25,9%. Data ini menunjukkan bahwa masalah kesehatan gigi dan mulut membutuhkan penanganan yang serius untuk mencegah peningkatan prevalensi di masa mendatang. Di Indonesia, penyakit periodontal menduduki urutan kedua setelah karies gigi dan menjadi salah satu masalah gigi dan mulut yang banyak terjadi di masyarakat (Kemenkes, 2013).

Periodontitis adalah suatu penyakit peradangan pada jaringan penyanga gigi yang disebabkan oleh iritasi bakteri, yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema* dan spesies *Eubacterium*. Periodontitis dapat menyebabkan kerusakan jaringan periodontal dan tulang alveolar, terbentuknya poket, serta terjadinya resesi. Periodontitis diawali dengan pembentukan plak yang melekat pada permukaan gigi. Plak gigi merupakan lapisan tipis biofilm yang mengandung koloniasi bakteri, produk bakteri, dan sisa makanan (Newman *et al.*, 2015).

Salah satu klasifikasi penyakit periodontal adalah periodontitis agresif. Periodontitis agresif merupakan penyakit pada jaringan penyanga gigi yang memiliki karakteristik berupa kerusakan ligamen periodontal dan tulang alveolar yang cepat. Pada periodontitis agresif, kehilangan perlekatan dan resesi gingiva terjadi empat kali lebih cepat dibandingkan

periodontitis kronis. Bakteri yang berperan penting dalam menyebabkan periodontitis agresif adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Armitage and Cullinan, 2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diketahui sebagai secondary colonizers yang berperan pada terbentuknya plak gigi subgingiva. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* termasuk bakteri gram negatif yang bersifat fakultatif anaerob berbentuk batang dan sebagai bakteri komensal di rongga mulut (Sriraman *et al.*, 2014).

Penyakit periodotitis dapat dicegah atau ditanggulangi dengan kontrol plak yang adekuat, seperti menyikat gigi, menggunakan obat kumur, larutan irigasi, maupun pasta gigi yang mengandung substansi antibakteri (Newman *et al.*, 2015). Obat-obatan antibakteri yang biasa digunakan untuk menyembuhkan masalah gigi dan mulut diantaranya adalah obat kumur povidone iodine, klorheksidin glukonat, tetracyclin yang tersedia dalam sediaan obat kumur, dan antibiotik sistemik berupa metronidazole yang dikombinasikan dengan amoxicilin. Banyak pasien gigi dan mulut yang resisten terhadap penggunaan obat-obatan sintetis (Utami, 2012). Adanya peningkatan resistensi terhadap antibiotika, menjadikan pencarian dan pengembangan agen antimikroba dari alam menjadi prioritas. Dengan efek terapi yang lebih baik dan efek samping yang sedikit, bioavabilitas yang bagus, dan toksisitas yang minimal menjadikan penggunaan antimikrobal alam menjadi pilihan utama untuk menangani resistensi antibiotik (Cheung *et al.*, 2014). Salah satu jenis tanaman yang memiliki efek antibakteri adalah tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terutama pada bagian daunnya (Mukhlisoh, 2010).

Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) memiliki efek antibakteri karena memiliki kandungan zat aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Kandungan zat aktif dalam daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) yang memiliki efek antibakteri adalah flavonoid, tanin dan saponin (Liantari, 2014). Flavonoid memiliki efek antibakteri dengan mekanisme menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi (Lamothe *et al.*, 2009). Sedangkan tanin dan saponin memiliki efek antibakteri dengan cara

mengganggu tegangan permukaan dinding sel sehingga dinding sel menjadi rusak (Karlina dkk., 2013).

Penelitian menggunakan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri telah dilakukan sebelumnya. Menurut penelitian Das *et al* (2011), ekstrak metanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) memiliki efek antibakteri pada bakteri gram negatif, yaitu *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibro parahemolyticus*, *Shigella boydii*, *Vibro mimicus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan penelitian ini, efek antibakteri yang dihasilkan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) disebabkan karena adanya kandungan zat aktif yaitu flavonoid, saponin, dan triterpenoid (Das *et al*, 2011).

Meskipun daun belimbing wuluh memiliki efek antibakteri, tetapi pemanfaatan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) masih kurang optimal. Buah dari belimbing wuluh lebih banyak dimanfaatkan daripada bagian daunnya. Padahal pada bagian buah dari belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) banyak mengandung asam oksalat yang dapat memberikan efek samping pada tubuh seperti gagal ginjal atau neuropati akut (Alhassan and Ahmed, 2016).

Adanya beberapa zat aktif pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) yang memiliki potensi mengantikan antibakteri sintetis dan belum adanya penelitian yang membuktikan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, maka diperlukan sebuah penelitian untuk menguji efektivitas ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan permasalahan diatas, penulis ingin meneliti apakah ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) efektif sebagai antibakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efektivitas ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm secara *in vitro*.
2. Mengetahui hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) dengan konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat akademis

1. Penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai efektivitas ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm secara *in vitro*.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar teori untuk menyusun penelitian selanjutnya menggunakan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*).

1.4.2 Manfaat Praktis

Masyarakat dapat mengetahui khasiat daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai salah satu tanaman tradisional yang dapat digunakan sebagai antibakteri.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jaringan Periodontal

Jaringan periodontal adalah jaringan penyangga gigi yang terbagi menjadi dua sistem jaringan yaitu struktur perlekatan dan gingiva. Struktur perlekatan terdiri dari sementum, tulang alveolar, dan ligamen periodontal (Vandersall, 2013).

2.1.1 Gingiva

Gingiva adalah bagian mukosa rongga mulut yang mengelilingi gigi dan menutupi *ridge* alveolar. Gingiva berfungsi melindungi jaringan dibawah perlekatan gigi terhadap pengaruh lingkungan rongga mulut. Secara anatomis, gingiva dibagi menjadi tiga bagian, yaitu margin gingiva, *attached gingiva*, dan *interdental gingiva* (Manson and Eley, 2012).

Margin gingiva atau *unattached gingiva* merupakan tepi gingiva yang mengelilingi gigi. Pada 50 % kasus, margin gingiva dengan *attached gingiva* dibatasi oleh cekungan dangkal yang disebut *free gingival groove*. Lebar margin gingiva sekitar satu mm dan menjadi dinding dari sulkus gingiva. Sulkus gingiva adalah celah dangkal atau ruang di sekitar gigi yang dibatasi oleh permukaan gigi di satu sisi dan epitel yang melapisi *free margin* gingiva di sisi lain. Kedalaman sulkus gingiva normal berkisar dua sampai tiga mm (Newman *et al.*, 2015).

Attached gingiva merupakan sambungan dari margin gingiva yang bersifat kaku, elastis, serta melekat dengan erat ke dasar periosteum dari tulang alveolar. Permukaan *attached gingiva* mempunyai *stippling* yang mirip seperti kulit jeruk dan tampak jelas pada permukaan fasial. Lebar dari *attached gingiva* pada bidang fasial bervariasi, tergantung lokasinya. *Attached gingiva* yang paling lebar terdapat pada regio insisivus (3,5-4,5 mm pada rahang atas dan 3,3-3,9 mm pada rahang bawah), serta lebih sempit pada regio porterior (1,9 mm pada maksila dan 1,8 mm pada mandibula) (Newman *et al.*, 2015).

Interdental gingiva adalah gingiva yang berada diantara dua gigi yang saling berkontak. Dapat berbentuk piramida atau

berbentuk seperti ‘col’. ‘Col’ merupakan cekungan yang menghubungkan papila fasial dengan papila lingual (Armitage and Cullinan, 2010).

2.1.2 Sementum

Merupakan jaringan mesenkimal terkalsifikasi dan tidak memiliki vaskularisasi yang membentuk lapisan luar serta menutupi anatomi akar. Terdapat dua tipe sementum, yaitu aselular (*primary*) dan selular (*secondary*). Sementum aselular merupakan sementum yang pertama kali terbentuk. Sementum ini menutupi 1/3 atau ½ dari akar dan tidak mengandung sel. Sementum ini terbentuk sebelum gigi mencapai bidang oklusal. Sementum selular terbentuk setelah gigi mencapai bidang oklusal, bersifat lebih ireguler dan mengandung sel sementosit yang saling berkomunikasi melalui sistem *anastomosing canaliculi*. Sementum selular kurang terkalsifikasi dibandingkan dengan sementum aselular (Reddy, 2014).

Ketebalan sementum pada ½ koronal akar bervariasi, mulai dari 16-60 µm. Namun pada 1/3 apikal akar dan area furkasi, ketebalan sementum berkisar 150-200 µm. Lebih tebal pada permukaan distal dibandingkan dengan permukaan mesial, kemungkinan disebabkan oleh rangsangan fungsional dari pergerakan mesial sepanjang waktu (Manson and Eley, 2012).

2.1.3 Tulang Alveolar

Tulang alveolar merupakan bagian dari maksila dan mandibula yang membentuk dan menyangga soket gigi (alveolus). Tulang alveolar terbentuk ketika gigi erupsi untuk menyediakan tempat perlekatan saat ligamen periodontal terbentuk dan menghilang secara bertahap setelah gigi hilang (Armitage and Cullinan, 2010).

2.1.4 Ligamen Periodontal

Ligamen periodontal tersusun atas pembuluh darah kompleks dan jaringan ikat seluler yang sangat banyak, mengelilingi akar gigi dan menghubungkan dengan dinding bagian dalam dari tulang alveolar. Ligamen periodontal berhubungan dengan jaringan ikat gingiva dan berkomunikasi dengan sumsum tulang melalui kanal pembuluh darah di dalam tulang. Lebar rata-rata ruang ligamen periodontal sekitar 0,2 mm (Creanor, 2016).

2.2. Periodontitis

Periodontitis merupakan proses inflamasi dari jaringan pendukung gigi yang disebabkan oleh mikroorganisme spesifik atau grup dari mikroorganisme tersebut. Proses tersebut akan menghasilkan destruksi progresif dari ligamen periodontal dan tulang alveolar, dengan pembentukan poket, resesi, atau keduanya (Newman *et al.*, 2015).

Potensi patogenik bakteri pada plak bervariasi dari satu bagian gingiva ke bagian gingiva lainnya. Jumlah plak yang sedikit dapat ditoleransi oleh sistem pertahanan tubuh tanpa menyebabkan penyakit periodontal. Jika jumlah bakteri pada plak meningkat melebihi ambang batas pertahanan tubuh manusia, akan terjadi pergeseran keseimbangan (dari sehat, menjadi sebuah penyakit) (Reddy, 2014).

Berdasarkan *American Academy of Periodontology* (AAP), periodontitis diklasifikasikan menjadi periodontitis agresif, periodontitis kronis, dan periodontitis sebagai manifestasi dari penyakit sistemik (Armitage and Cullinan, 2010).

2.2.1 Patogenesis Periodontitis

Lesi awal pembentukan periodontitis ditandai dengan invasi bakteri yang menyebabkan inflamasi gingiva. Bila iritasi plak dan inflamasi terus berlanjut, penjalanan inflamasi dari gingiva akan berpindah ke struktur periodontal pendukung. Perpindahan ini diduga sebagai hasil modifikasi potensi patogenik plak, atau oleh daya tahan tubuh dari *host* (Kinane and Mombelli, 2012).

Tahap pertama dalam proses terjadinya periodontitis adalah terbentuknya poket periodontal. Poket periodontal terbentuk akibat rusaknya serabut kolagen yang berada di apikal dari *junctional epithelium*. Terdapat dua kemungkinan mekanisme rusaknya serabut kolagen tersebut. Kolagenase dan enzim lisosomal yang dilepas oleh LPN dan makrofag akan menghancurkan serabut kolagen. Sedangkan fibroblast akan memfagositosis serabut kolagen dengan cara meresorpsi fibril kolagen dan matriks fibril yang tertanam dalam sementum (Obiechina, 2011).

Tahap kedua setelah terbentuknya poket periodontal adalah resorpsi tulang alveolar. Proses resorpsi tulang alveolar dapat berlangsung karena aktivitas mediator inflamasi seperti PGE2, enzim, dan sel-sel tertentu. Dua sel yang terlibat pada resorpsi tulang alveolar adalah osteoklas dan sel monosit. Osteoklas bekerja menyingkirkan bahan mineral tulang, sedangkan monosit berperan dalam degradasi matriks organik tulang (Obiechina, 2011).

2.2.2 Periodontitis Agresif

Periodontitis agresif memiliki ciri yang berbeda dengan periodontitis kronis dalam hal perkembangan penyakit. Berdasarkan luas penyebarannya, periodontitis agresif dibedakan menjadi *localized aggressive periodontitis* dan *generalized aggressive periodontitis*. Bakteri yang berperan penting sebagai faktor etiologi periodontitis agresif adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan *Porphyromonas gingivalis* (Noack and Hoffman, 2004).

Selain faktor mikrobiologi, periodontitis agresif juga dapat dipengaruhi oleh faktor imunologi. Seseorang dengan kelainan HLA (*Human Leucocyte Antigen*) akan lebih rentan terserang periodontitis agresif. Hal ini disebabkan oleh respon imun yang berlebihan didalam tubuh. Kelainan HLA tersebut dapat diturunkan secara genetik, sehingga faktor genetik juga berpengaruh terhadap risiko untuk terserang periodontitis agresif (Bostancı and Belibasakis, 2012).

Progresi penyakit ini biasanya sangat cepat, empat kali lebih cepat dari periodontitis kronis. Walaupun pada individu yang terlihat sehat tanpa akumulasi plak dan kalkulus yang besar, periodontitis agresif tetap dapat menyerang. Periodontitis agresif memperlihatkan progresi berupa hilangnya perlakatan jaringan ikat dan kerusakan tulang alveolar secara aktif. Pada beberapa penderita, dapat ditemukan abses periodontal dan pembesaran kelenjar getah bening regional (Newman *et al.*, 2015).

2.3 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans merupakan bakteri komensal rongga mulut yang ditemukan pada bagian subgingiva dari manusia dan mamalia. Pada umumnya ditemukan

pada lesi infeksi parah khususnya pada penyakit periodontal (Paino, 2013).

2.3.1 Taksonomi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Taksonomi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menurut Mythireyi dan Krishnababa (2012) tampak pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Taksonomi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Mythireyi and Krishnababa, 2012)

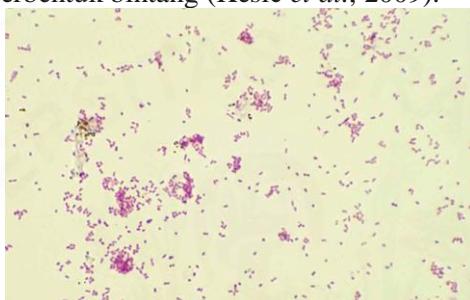
Kingdom	<i>Bacteria</i>
Filum	<i>Proteobacteria</i>
Kelas	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordo	<i>Pasteurellales</i>
Famili	<i>Pasteurellaceae</i>
Genus	<i>Aggregatibacter</i>
Spesies	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>

Aggregatibacter actinomycetemcomitans mengalami beberapa kali penamaan. Pada tahun 1912, Klinger menamai bakteri tersebut *Bacterium actinomycetemcomitans*. Lalu diubah oleh Topley dan Wilson pada tahun 1929 menjadi *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dan mengalami perubahan kembali menjadi *Haemophilis actinomycetemcomitans* oleh Potts dkk pada tahun 1985. Penamaan terbaru diusulkan oleh Norskov-Lauritsen dan Killian pada tahun 2006 dengan nama *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Norskov-Lauritsen and Killian, 2006).

2.3.2 Morfologi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans merupakan bakteri fakultatif anaerob, gram-negatif, *nonmotile*, tidak berspora, merupakan bakteri batang kecil, dan memiliki ukuran 0,4-0,5 μm x 1,0-1,5 μm (Henderson *et al.*, 2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memiliki bentuk koloni yang berbeda-beda sesuai media pertumbuhannya. Pada media cair, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cenderung tumbuh dalam butiran kecil yang menempel pada dinding botol.

Sedangkan pada media agar, awal terbentuknya koloni akan terlihat halus, berbentuk kubah, dan tembus pandang yang pada akhirnya akan berbentuk menyerupai bintang, bergelombang, dan membentuk parit pada agar. (Slots and Ting, 2007). Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang baru diisolasi dari rongga mulut manusia, selalu berpilus dan berbentuk kecil ($\pm 1\text{ mm}$), permukaan kasar, koloni translusen, dengan morfologi internal berbentuk bintang (Kesic *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 Gambaran mikroskopik *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* perbesaran 400x (Mahon *et al.*, 2014)

2.3.3 Faktor Virulensi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans memiliki faktor virulensi utama berupa leukotoksin, *Cytoclethal Distending Toxins (CDT)*, *Surface-associated Material (SAM)*, lipopolisakrida, dan kolagenase (Kler and Malik, 2010).

Leukotoksin *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan protein yang termasuk dalam anggota dari toksin *RTX (Repeats in Toxin)* yang membantu bakteri untuk mengecoh respon imun *host* saat infeksi. Target utama dari leukotoksin adalah sel PMN, monosit, limfosit T, dan makrofag manusia. Peran leukotoksin dalam kematian sel adalah dengan cara nekrosis dan apoptosis (Henderson *et al.*, 2010).

Cytoclethal Distending Toxins (CDT) mempunyai aktivitas sebagai penghancur DNA sehingga menginduksi terjadinya apoptosis. Selain menghancurkan DNA, *CDT* dapat mendegradasi kromosom DNA yang akan mengganggu siklus sel sehingga terjadi hambatan pada proliferasi sel ligamen periodontal dan sel fibroblas gingiva. Hal ini menyebabkan

tertundanya penyembuhan dan memperparah lesi periodontitis (Matangkasombut *et al.*, 2010).

Surface-associated Material (SAM) memiliki aktivitas osteolitik yang potensial yang dinamakan Chaperonin 60. SAM pada bakteri ini juga memiliki protein yang disebut gapstain yang dapat menghentikan pertumbuhan sel pada fase G2 (Henderson *et al.*, 2010).

Lipopolisakarida (LPS) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memiliki spektrum imunologik yang luas pada aktivitas endotoksik. Lipopolisakarida pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dapat menstimulasi makrofag untuk menghasilkan interleukin (interleukin 1 α , interleukin 1 β) dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang kemudian berdampak pada terjadinya inflamasi dan resorpsi tulang alveolar. Mekanisme dari resopsi tulang tersebut terjadi karena lipopolisakarida pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mengaktifasi komplemen yang kemudian menstimulasi prostaglandin untuk memproduksi interleukin (interleukin 1 α , interleukin 1 β) dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF) (Manson and Eley, 2010).

Selain lipopolisakarida, kerusakan jaringan pada periodontitis juga dipengaruhi oleh kolagenase. Kolagenase merupakan komponen matriks ekstraselular bakteri yang dapat menyerang serat-serat kolagen sehingga menyebabkan degradasi kolagen pada jaringan periodontal (Kler and Malik, 2010).

2.3.4 Karakteristik Biokimia *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Pada media agar coklat dan agar darah, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* memperlhatikan pertumbuhan yang lambat. Koloni baru tampak setelah 48 – 72 jam. Terlihat koloni kecil, halus, transparan, non hemolitik, dan memiliki tepi sedikit tidak teratur. Masa inkubasi lama (lima sampai tujuh hari), dan dapat berkembang dengan pusat kepadatan yang muncul seperti empat atau enam titik bintang. Karakteristik ini hilang pada subkultur berulang dan koloni menjadi kurang melekat. PH optimal untuk *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah

antara 7,0 – 8,0 dalam medium yang mengandung 0,5 – 1% NaCl (Mythireyi and Krishnababa, 2012).

2.4 Biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Biofilm merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang melekat pada suatu permukaan. Biofilm dilindungi oleh matriks ekstraseluler yang disebut *extracellular polymeric substance* (EPS), dimana EPS merupakan produk yang dihasilkan oleh mikroorganisme itu sendiri. Bakteri didalam biofilm mampu bertahan terhadap antibiotik, desinfektan, bahkan tahan terhadap sistem imunitas *host*. Mikroba dalam biofilm cenderung tumbuh dan berkembang dengan pesat hingga membentuk koloni terutama pada permukaan yang lembab dan kaya akan nutrisi (Tarver, 2009).

Umumnya biofilm terbentuk dari kolonisasi antara *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* dan *Veillonella sp.* Namun, *Fusobacterium nucleatum* dan *Veillonella sp.* hanya dapat bertahan hidup jika mendapat asupan glukosa yang diproduksi oleh *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Sehingga *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dapat membentuk biofilm tanpa harus berkolonisasi dengan *Fusobacterium nucleatum* dan *Veillonella sp.* (Periasamy and Kolenbrander, 2009).

2.5 Uji Identifikasi Bakteri

2.5.1 Pewarnaan Gram

Uji identifikasi bakteri dengan pewarnaan gram dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang tumbuh adalah bakteri gram negatif. Cara melakukan pewarnaan gram adalah dengan mengambil plak subgingiva dari penderita priodontitis, kemudian diulaskan pada kaca (*smear*) dan dilakukan fiksasi. Selanjutnya, sediaan pada kaca preparat ditetes dengan kristal violet selama 1 menit, lalu sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan ditetes dengan *mordant* (*lugol's iodine*) selama 1 menit, lalu sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan kemudian ditetes dengan larutan etanol 96% setetes demi setetes hingga etanol yang jatuh berwarna jernih. Sisa etanol dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan ditetes counterstain

(safranin), ditunggu selama 45-60 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap. Setelah kering, sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x dengan diberi minyak emersi. Perbesaran tersebut dianggap cukup untuk mengamati bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan tercatat merah yang menandakan bahwa bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan bakteri gram negatif. (Kachlany, 2010).

2.5.2 Pengamatan Morfologi Sel Bakteri

Morfologi sel bakteri dilihat dengan mikroskop menggunakan preparat yang telah dibuat pada tes pewarnaan gram. Sel bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan terlihat berbentuk kokobasilus, yaitu perpaduan antara bentuk bulat dan batang (Sriraman *et al.*, 2014).

2.5.3 Uji Katalase

Uji katalase merupakan suatu pengujian untuk membedakan apakah suatu bakteri merupakan bakteri aerob atau bakteri anaerob berdasarkan kemampuannya menghasilkan enzim katalase. Sebagian besar bakteri aerob dan bakteri anaerob akan memproduksi hidrogen peroksida yang bersifat toksik terhadap bakteri tersebut. Bakteri aerob dapat tetap hidup karena bakteri golongan tersebut menghasilkan enzim katalase yang bisa mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Sebaliknya, bakteri anaerob akan mati bila terpapar oksigen karena tidak adanya pembentukan enzim katalase sehingga hidrogen peroksida meracuni bakteri itu sendiri (Kango, 2010).

Uji katalase dilakukan dengan mengambil satu ose koloni dan diinokulasi pada kaca preparat. Selanjutnya diteteskan sebanyak satu tetes hidrogen peroksida (H_2O_2) 15% lalu diamati pembentukan gelembung pada inokulum bakteri. Pembentukan gelembung menunjukkan uji katalase positif. Uji katalase *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil positif (Macinnes and Lally, 2006).

2.5.4 Uji Oksidase

Uji oksidase digunakan untuk mengidentifikasi apakah suatu bakteri dapat memproduksi enzim *cytochrome c oxidase*. Enzim tersebut dapat mengoksidase substrat *tetramethyl-p-phenylenediamine* menjadi *indophenols*.

Uji oksidase dilakukan dengan cara menginokulasikan satu ose koloni bakteri pada kertas filter yang telah direndam dengan substrat *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydchloride* selama 10-30 detik dan diamati perubahan warna yang ada. Uji Oksidase dikatakan positif apabila terdapat perubahan warna menjadi biru tua atau ungu dan dikatakan negatif apabila tidak terjadi perubahan warna. Uji oksidase *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan menunjukkan hasil yang positif. (Acharya,2012)

2.5.5 Uji Hemolisis

Uji Hemolisis digunakan untuk mengklasifikasikan mikroorganisme tertentu, dengan cara mengamati kemampuan koloni bakteri untuk menginduksi hemolisis bila ditanam pada agar darah (*blood agar*). Metode ini ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni. *Blood agar* atau agar darah biasanya dibuat dari *tryptic soy agar* dengan darah domba 5% (Chamanrokh *et al.*, 2008).

Ada 3 jenis reaksi hemolisis, yaitu beta hemolisis (β), alfa hemolisis (α), dan gamma hemolisis (γ). Beta hemolisis (β) disebut hemolisis total, didefinisikan sebagai lisis seluruh sel darah merah. Alfa hemolisis (α) disebut hemolisis sebagian, didefinisikan sebagai penurunan hemoglobin sel darah merah dalam medium sekitar koloni. Gamma hemolisis (γ) disebut sebagai non-hemolisis. Gamma menunjukkan kurangnya hemolisis atau dapat dikatakan tidak ada reaksi dalam medium sekitar. Pada uji hemolisis ini, bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan menunjukkan reaksi berupa beta hemolisis (β). Hal ini disebabkan oleh adanya hemolisin pada bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang diproduksi oleh leukotoksin dari bakteri tersebut (Balashova *et al.*, 2006).

2.5.6 Uji Agar MacConkey

Uji agar MacConkey merupakan uji selektif dan berperan sebagai media differensial yang digunakan untuk mendeteksi dan isolasi mikroorganisme gram negatif. Agar MacConkey biasa digunakan untuk membedakan antara bakteri gram negatif yang dapat memfermentasikan laktosa dari bakteri gram negatif yang tidak dapat memfermentasikan laktosa. Komposisi agar MacConkey terdiri dari pepton, laktosa monohidrat, garam empedu, natrium klorida, *neutral red*, *crystal violet*, agar, dan aquades. Pada uji agar MacConkey, bakteri yang dapat memfermentasi laktosa akan tumbuh dan akan berwarna merah muda hingga merah bata atau tidak ada pengendapan dari garam empedu di sekitar koloni. Sebaliknya, bakteri yang tidak dapat memfermentasi laktosa akan tumbuh tidak berwarna atau jernih (Tille, 2015).

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang dilakukan uji menggunakan agar MacConkey, tidak akan terjadi proses fermentasi laktosa, yaitu tidak berwarna atau jernih. Hal ini disebabkan karena *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tidak memiliki enzim *beta galaktosidase* ataupun *enzim pernias*. Kedua enzim tersebut berfungsi untuk memotong ikatan glukosa dan galaktosa dan memfermentasikannya menjadi asam (Tille, 2015).

2.6 Uji Identifikasi Biofilm

2.6.1 Metode Kultur Jaringan

Metode ini dianggap sebagai metode standar yang digunakan sebagai identifikasi biofilm. Isolat mikroorganisme dari *plate* agar diinokulasi dalam 10 ml TSB (*Trypticase Soy Broth*) yang ditambahkan 1% glukosa. Kemudian TSB tersebut diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil kultur tersebut kemudian diencerkan menggunakan medium dengan perbandingan 1:100. Hasil pengenceran tersebut dimasukkan ke dalam *well* yang berisi *plate polystyrene* sebagai media pertumbuhan jaringan. Mikroorganisme kontrol juga diinkubasi, diencerkan, dan ditambahkan ke dalam media pertumbuhan jaringan. Kontrol negatif berisi TSB steril yang sudah

diinokulasi. Plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, isi dari *well* dibuang dengan cara mengetuk *well* secara perlahan. Kemudian *well* dibilas menggunakan 0,2 ml *phosphate buffer saline* (pH 7,2) sebanyak empat kali. Pembilasan ini dilakukan untuk menghilangkan bakteri yang tersebar bebas. Biofilm yang terbentuk oleh bakteri *adherent* pada dinding *well* difiksasi menggunakan 2% sodium asetat dan dilakukan pengecatan menggunakan kristal violet (0,1%). Kelebihan kristal violet dibuang menggunakan air yang sudah dideionisasi dan dikeringkan. *Optical density (OD)* dari biofilm yang sudah dilakukan pengecatan didapatkan dengan menggunakan *micro ELISA autoreader* (model 680, biorad, UK), dengan panjang gelombang 570 nanometer. Uji identifikasi ini diulang sebanyak tiga kali. Kemudian hasil interpretasi produk biofilm disesuaikan dengan kriteria Stepanovic *et al* (Hassan *et al.*, 2011).

2.6.2 Metode Tabung

Metode tabung merupakan metode identifikasi biofilm kualitatif. Mikroorganisme yang akan diuji diinokulasi pada 10 ml TSB yang ditambahkan 1% glukosa di dalam tabung reaksi. Tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, isi dari tabung reaksi dibuang dan dibilas menggunakan *phosphate buffer saline* (pH 7,3) dan dikeringkan. Tabung reaksi kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet (0,1%). Kelebihan kristal violet dibersihkan menggunakan air yang sudah dideionisasi. Tabung reaksi dikeringkan pada posisi terbalik. Skor untuk metode tabung dilakukan sesuai dengan hasil *strain* kontrol. Terbentuknya biofilm dikatakan positif apabila terlihat bentukan garis-garis film pada dinding dan dasar tabung reaksi. Banyaknya bentukan biofilm ditentukan dengan skor yaitu 1-lemah/tidak ada, 2-sedang, dan 3-tinggi/kuat. Uji identifikasi ini diulang sebanyak tiga kali (Hassan *et al.*, 2011).

2.6.3 Metode Congo Red Agar

Pada tahun 1989, Freeman *et al.* menemukan metode kualitatif sederhana untuk mendeteksi terbentuknya biofilm dengan menggunakan medium *congo red agar (CRA)*. Medium CRA disiapkan dengan bahan Brain Heart Infusion Broth 37 g/L,

sukrosa 50 g/L, agar nomor 1 10 g/L dan indikator *congo red* 8 g/L. Pertama, pewarna *congo red* dipersiapkan dan di autoklaf (121°C selama 15 menit) terpisah dari medium lainnya. Pewarna *congo red* ditambahkan ke dalam BHIA yang ditambahkan sukrosa dan telah di autoklaf pada suhu 55°C. CRA kemudian diinokulasi dengan mikroorganisme dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam kondisi aerob. Koloni berwarna hitam dengan konsistensi seperti kristalin kering mengindikasikan bahwa biofilm sudah terbentuk. Uji identifikasi ini dilakukan sebanyak tiga kali (Hassan *et al.*, 2011).

2.7 Uji Kepekaan Antimikroba

2.7.1 Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan metode untuk menguji kepekaan antimikroba dengan memasukkan sejumlah zat antimikroba ke dalam medium bakteriologi padat atau cair. Metode dilusi dapat digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) secara *in vitro*. Tujuan metode ini adalah untuk mengetahui seberapa banyak jumlah zat antimikroba yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan (KHM) atau membunuh (KBM) bakteri yang diuji. Keuntungan metode dilusi adalah metode ini memungkinkan adanya hasil kuantitatif, yang menunjukkan jumlah konsentrasi tertentu yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh bakteri yang diuji (Brooks *et al.*, 2013).

Prinsip metode dilusi adalah melakukan pengenceran konsentrasi zat antimikroba dalam tabung yang berisi media cair dan diinokulasi dengan bakteri uji, lalu diamati tingkat kekeruhannya. Konsentrasi paling rendah dari tabung berisi media cair yang mulai jernih dinyatakan sebagai kadar hambat minimum (KHM). Tabung berisi media cair yang jernih diinokulasikan dengan cara digoreskan pada media *plate* agar, diinkubasi, dan diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni pada permukaan media *plate* agar. Konsentrasi paling rendah dari tabung yang jernih dan menunjukkan tidak ada pertumbuhan pada media *plate* agar dinyatakan sebagai kadar bunuh minimum (KBM) (Forbers *et al.*, 2007).

2.7.2 Metode Difusi

Metode difusi yang paling luas digunakan adalah metode difusi sumuran. Metode ini dikerjakan dengan cara membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri. Lubang tersebut kemudian diisi dengan larutan yang akan diuji, kemudian diinkubasi. Setelah inkubasi, akan terbentuk zona jernih di sekitar sumuran yang akan diukur diameternya sebagai ukuran kekuatan inhibisi obat melawan organisme uji tertentu (Jorgensen and Ferraro, 2009).

2.8 Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*)

2.8.1 Klasifikasi Tumbuhan

Taksonomi tanaman belimbing wuluh dalam sistematika tumbuhan tampak pada Tabel 2.2 (Purwaningsih dan Eko, 2007).

**Tabel 2.2 Taksonomi Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*)
(Purwaningsih dan Eko, 2007)**

Kingdom	Plantae
Divisi	<i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	<i>Angiospermae</i>
Kelas	<i>Dicotyledonae</i>
Ordo	<i>Oxalidales</i>
Famili	<i>Oxalidaceae</i>
Genus	<i>Averrhoa</i>
Spesies	<i>Averrhoa bilimbi</i>

Belimbing wuluh memiliki pohon kecil, tinggi dapat mencapai 5-10 m dengan batang tidak begitu besar, dan mempunyai diameter hanya sekitar 30 cm. Daunnya majemuk, dengan panjang 30-60 cm, dan berkelompok. Hal ini tampak pada Gambar 2.2. Daun belimbing wuluh berupa daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun. Anak daun bertangkai pendek, bentuknya bulat telur sampai jorong, ujung runcing, pangkal membundar, tepi rata, panjang 2-10 cm, lebar 1-3 cm, warnanya hijau, permukaan bawah hijau muda (Lathifah, 2008).



Gambar 2.2 Tanaman Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*)

Ket: A. Pohon Belimbing Wuluh, B. Daun Belimbing Wuluh
 (Moran, 2011; Kementerian Pertanian Badan Penyuluhan dan Pengembangan Sumber Daya Manusia Pertanian, 2015)

Perbungaan berupa malai, bunganya kecil, berkelompok, keluar langsung pada batang dan cabangnya dengan tangkai bunga berambut. Menggantung dengan panjang 5-20 mm dan berwarna ungu kemerahan. Buah belimbing wuluh mirip dengan daunnya. Berbentuk bulat lonjong, beruang lima, dan berbiji. Berwarna hijau pekat waktu muda dan kekuningan setelah matang atau tua (Purwaningsih dan Eko, 2007).

2.8.2 Kandungan Kimia Belimbing Wuluh

Buah belimbing wuluh mengandung senyawa *flavonoid*, *alkaloid*, *coumarins*, saponin, tannin, fenol, *valepotriates*, *coumarin*, dan *terpenes*. Selain senyawa diatas, buah belimbing wuluh juga mengandung karbohidrat, protein, asam amino, dan minyak esensial. Daun belimbing wuluh mengandung *alkaloid*, tannin, saponin, *flavonoid*, glukosida jantung, glukosida, fenol, dan karbohidrat (Valsan and K Raphael, 2016).

Diantara senyawa aktif yang terkandung dalam daun belimbing wuluh, terdapat senyawa yang memiliki efek antibakteri yaitu senyawa *flavonoid*, saponin, dan tannin. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Saponin membentuk

ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin (protein transmembran) yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa. Kerusakan porin mengakibatkan berkurangnya permeabilitas membran sel, sel kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati. Tanin memiliki mekanisme mengkerutkan membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel (Purwita dkk., 2013).

2.9 Metode Ekstraksi

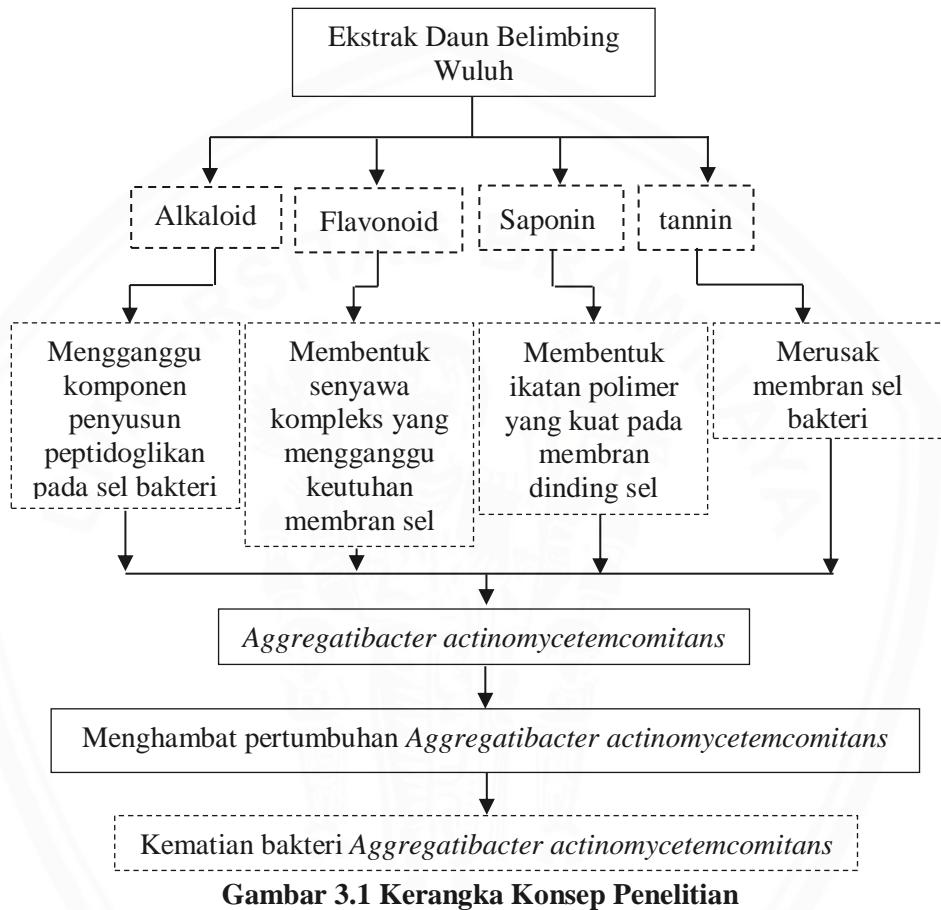
Ekstraksi merupakan salah satu proses pemisahan senyawa yang terkandung dalam tumbuhan. Dapat menggunakan tumbuhan segar maupun tumbuhan yang sudah dikeringkan. Terdapat beberapa teknik ekstraksi, yaitu maserasi, perkolası, dekok, dan *soxhlet*. Salah satu metode ekstraksi yang banyak digunakan adalah metode maserasi (Zhang *et al.*, 2011).

Ekstraksi dengan metode maserasi dilakukan dengan cara merendam dan mencampurkan antara pelarut dengan serbuk tumbuhan. Campuran ini didiamkan selama tiga hari dalam suhu ruangan sambil dilakukan pengadukan secara terus menerus. Campuran disaring dan ampasnya diperas, kemudian dilakukan pemisahan antara larutan dan padatan dengan cara menuangkan cairan secara perlahan sehingga endapan tertinggal dibagian dasar bejana. Metode ekstraksi maserasi sangat menguntungkan karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur waktu perendamannya. Oleh Karena itu, dengan metode ini akan didapatkan senyawa aktif yang lebih banyak (Handa *et al.*, 2008).

BAB 3

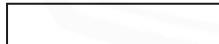
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep

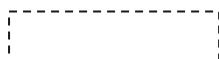


Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :



Penelitian dilakukan



Penelitian tidak dilakukan

3.2 Penjelasan kerangka konsep

Daun belimbing wuluh mengandung *alkaloid*, tannin, saponin, *flavonoid*, glukosida jantung, glukosida, fenol, dan karbohidrat. Senyawa alkaloid memiliki mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Saponin membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin (protein transmembran) yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa. Kerusakan porin mengakibatkan berkurangnya permeabilitas membran sel, sel kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati. Tanin memiliki mekanisme mengkerutkan membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel. Hal ini menyebabkan sel tidak dapat melakukan metabolisme, sehingga pertumbuhannya terhambat dan mati.

Jika keempat senyawa ini bertemu dengan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, maka senyawa tersebut akan menghambat pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada rongga mulut yang pada akhirnya akan menyebabkan kematian sel bakteri.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) memiliki efek antibakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm secara *in vitro*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah *true experimental design post test control only* dengan pengulangan yang sesuai dengan rumus pengulangan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm. Metode penelitian ini yaitu dengan metode difusi sumuran untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai anti bakteri terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pembentuk biofilm.

4.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Sampel Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) didapatkan dari UPT. Materia Medika Batu. Keaslian spesies sampel daun belimbing wuluh dapat dibuktikan dengan adanya sertifikat kepastian spesies.

4.4 Pengulangan Sampel

Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito adalah sebagai berikut (Solimun, 2001 *dalam* Kumboyono, 2011):

$$p(n-1) \geq 16$$

$$7(n-1) \geq 16$$

$$7n - 7 \geq 16$$

$$7n \geq 23 ; n \geq 3,2 ; n \geq 4$$

Keterangan :

$$p = \text{jumlah perlakuan}$$
$$n = \text{jumlah pengulangan}$$

Pengulangan dilakukan paling sedikit sebanyak empat kali.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% sebagai penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang dilihat dari diameter zona jernih yang terbentuk disekitar sumuran pada media agar.

4.6 Definisi Operasional

1. Simplicia daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) didapatkan dari UPT. Materia Medika Batu, Malang. Ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) adalah hasil dari penyaringan dan rangkaian proses laboratoris terhadap daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) dengan pelarut etanol 95% menggunakan metode maserasi. Ekstrak daun belimbing wuluh dibagi menjadi lima kelompok konsentrasi sebagai penelitian pendahuluan, yaitu 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%.
2. Isolat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah stok kultur murni Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang tidak bercampur dengan jenis mikroba lainnya dan telah dilakukan uji identifikasi bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Suspensi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah hasil pengenceran dari isolat murni melalui perbandingan secara visual dengan standar yang telah diketahui dengan menggunakan larutan standar Mc Farland. Mc Farland adalah penyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1% (Zamora and Perez-Gracia, 2011).
4. Nutrient Agar (NA) adalah media selektif untuk pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Tsuzukubashi *et al.*, 2008).
5. Kadar hambat minimum (KHM) adalah zona hambatan dari *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* berupa zona bening

yang terbentuk didaerah sekeliling sumuran yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan mm (Bussmann *et al.*, 2011).

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Simplisia Daun Belimbing Wuluh

Bahan yang digunakan adalah simplisia daun belimbing wuluh yang diperoleh dari UPT. Materia Medika Batu, Malang yang telah diidentifikasi dengan adanya sertifikat untuk membuktikan keaslian daun.

4.7.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

Alat yang digunakan adalah labu *Erlenmeyer*, timbangan, maserator berpengaduk elektronik, corong pemisah, grinder, alumunium foil, kertas saring Whattman, dan *rotary evaporator*. Bahan yang digunakan adalah simplisia daun belimbing wuluh dan larutan etanol 95%.

4.7.3 Alat dan Bahan untuk Kultur, Identifikasi bakteri, dan Uji Efektivitas

Alat untuk melakukan kultur, identifikasi bakteri dan uji efektivitas antara lain ose lurus, ose lengkung, mikropipet, kertas penghisap, minyak emersi, *petridisc*, tabung reaksi, bunsen, korek, mikroskop, *centrifuge*, dan inkubator. Bahan-bahan yang digunakan yaitu isolat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), *Nutrient Agar* (NA), aquadest, chlorhexidine gluconate 0,2%, dan hasil ekstrak daun belimbing wuluh.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian sebelumnya disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit (Nurdina dkk., 2012)

4.8.2 Persiapan Bahan

1. Daun belimbing wuluh dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan selama 7 hari pada suhu ruangan namun tidak terkena cahaya matahari langsung hingga daun mengering (Pendit dkk., 2016).

2. Isolat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dikultur pada media BHIA agar steril kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam (Brown, 2014).
3. Aquadest dan *Nutrient Agar* (NA) disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam lemari es (Brown, 2014).

4.8.3 Pembuatan Sediaan Ekstrak Belimbing Wuluh (Pendit dkk., 2016)

1. Daun belimbing wuluh yang sudah kering diblender halus. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi, yaitu dengan cara daun belimbing wuluh direndam dalam etanol 95% selama 72 jam dengan mengganti pelarut setiap 24 jam.
2. Hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring Whatman hingga tidak tersisa residu atau padatan.
3. Ekstrak etanol yang diperoleh difraksinasi dengan menggunakan n-heksan dan metanol (1:1). Fraksi metanol diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan fraksi yang kental dan dialiri gas N2 untuk menghilangkan metanol agar hasil ekstraksi bebas dari bahan pelarut.

4.8.4 Identifikasi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* maka dilakukan tes identifikasi bakteri. Tes yang dilakukan antara lain :

- 1) Pewarnaan Gram (Kachlany, 2010)
 - (1) Kaca preparat dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api dan dibiarkan dingin.
 - (2) Fiksasi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada kaca preparat dengan teknik preparat ulas (*smear*).
 - (3) Sediaan pada kaca preparat ditetes dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
 - (4) Sediaan ditetes dengan *mordant* (*lugol's iodine*) selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.

- (5) Sediaan ditetesi dengan larutan etanol 96% setetes demi setetes hingga etanol yang jatuh berwarna jernih. Sisa etanol dibuang dan dibilas dengan air.
 - (6) Sediaan ditetesi *counterstain* (safranin), ditunggu selama 45-60 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
 - (7) Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
 - (8) Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x dengan diberi minyak emersi, perbesaran tersebut dianggap cukup untuk mengamati bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
 - (9) Hasil positif : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tercat merah (gram-negatif).
- 2) Pengamatan morfologi bakteri (Sriraman *et al.*, 2014)
 - (1) Preparat hasil tes pewarnaan gram dilihat dibawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif perbesaran 1000x dengan diberi minyak emersi.
 - (2) Sel bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan terlihat berbentuk kokobasilus.
 - 3) Uji Katalase (Kango, 2010)
 - (1) Kaca preparat dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api dan dibiarkan dingin.
 - (2) Ambil satu ose koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diinokulasikan pada kaca preparat.
 - (3) Sediaan ditetesi dengan H₂O₂ 15% sebanyak satu tetes.
 - (4) Amati pembentukan gelembung pada inokulum bakteri.
 - (5) Uji katalase *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan menunjukkan hasil positif (terdapat pembentukan gelembung) yang menandakan bakteri bersifat anaerob.
 - 4) Uji Oksidase (Acharya, 2012)
 - (1) Rendam kertas filter kedalam substrat *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride*.

- (2) Ambil satu ose koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diinokulasikan pada kertas filter yang telah direndam substrat *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride*.
 - (3) Amati perubahan warna yang terjadi pada kertas filter setelah 10-30 detik.
 - (4) Uji oksidase *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan menunjukkan hasil positif (terdapat perubahan warna menjadi biru tua atau ungu) yang bakteri memproduksi enzim *cytochrome c oxidase*.
- 5) Uji Hemolisis (Balashova *et al.*, 2006)
- (1) Siapkan agar darah (*blood agar*) pada *petridisc* steril.
 - (2) Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diambil dengan ose steril dan ditamarkan pada media agar darah dengan menggunakan metode gores (streak).
 - (3) Media agar darah yang telah ditanami bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator selama 18-24 jam.
 - (4) Amati morfologi koloni yang terbentuk. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan menunjukkan reaksi beta hemolisis (β) atau hemolisis total yang ditandai dengan adanya zona jernih disekitar koloni bakteri.
- 6) Uji Agar MacConkey (Tille, 2015)
- (1) Siapkan agar MacConkey pada petri dish steril.
 - (2) Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diambil dengan ose steril dan ditamarkan pada media MacConkey dengan menggunakan metode gores (streak).
 - (3) Media MacConkey yang telah ditanami bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator selama 18-24 jam.
 - (4) Amati morfologi koloni yang terbentuk. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan menunjukkan hasil negatif, yaitu tumbuh tidak berwarna atau jernih.

4.8.5 Persiapan Suspensi Uji *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Brown, 2014)

1. Persiapkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA) yang telah uji identifikasi bakteri.
2. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diambil dengan ose dan disuspensikan dengan cara dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml NaCl 0,9% steril. Kekeruhan bakteri disetarakan dengan *Mc Farland* 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml).
3. Pengenceran bertingkat dilakukan dengan perbandingan 1:9 untuk sampel dan pengenceran pertama dan selanjutnya, sehingga pengenceran berikutnya mengandung 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya.
4. Siapkan tabung reaksi yang sudah diisi dengan 9 ml larutan NaCl 0,9%. Masukkan 1 ml suspensi *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ke dalam tabung pengenceran pertama (1/10 atau 10^{-1}) lalu dihomogenkan dengan vortex. Kemudian ambil 1 ml dari tabung 10^{-1} dan dimasukkan kedalam tabung 10^{-2} . Proses dilanjutkan hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang disetarakan dengan standar *Mc Farland* 0,5 yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

4.8.6 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Menggunakan Metode Tube-Test (Hassan et al., 2011)

1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang sudah didapat, diinokulasikan kedalam 10mL media *trypticase soy broth* yang ditambahkan 1% glukosa pada tabung reaksi.
2. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
3. Setelah diinkubasi, tabung reaksi dicuci menggunakan *phosphate buffer saline* (pH 7.3) dan dikeringkan.
4. Tabung reaksi diberi pewarna kristal violet (0,1%). Kelebihan pewarna dibuang atau dibersihkan menggunakan aquades steril dan dikeringkan.
5. Lihat formasi biofilm pada dinding tabung reaksi. Formasi biofilm *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans ditandai dengan adanya cincin berwarna ungu kebiruan yang melekat pada dinding tabung.

4.8.7 Uji Pendahuluan Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan Metode Difusi Sumuran (Greenwood, 1995)

1. Campurkan suspensi bakteri secara merata ke dalam cawan petri steril yang telah diberi media *Nutrient Agar* (NA). Dibiarkan hingga memadat.
2. Selanjutnya, media *Nutrient Agar* (NA) yang telah memadat diberi bentukan sumuran dengan diameter $\pm 6\text{mm}$ sebanyak 8 sumuran.
3. Setelah didapatkan bentukan sumuran pada media *Nutrient Agar* (NA), kemudian teteskan konsentasi ekstrak yang akan diuji, yaitu 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%, chlorhexidine gluconate 0,2% sebagai kontrol positif, dan akuades sebagai kontrol negatif kedalam sumuran tersebut.
4. Selanjutnya, media NA diinkubasi dalam inkubator dengan suku kamar 37°C selama 48 jam dalam suasana anaerob.
5. Setelah 48 jam, dilakukan pengukuran zona terang pada konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh yang diukur dengan menggunakan jangka sorong (Bussmann *et al.*, 2011).

4.8.8 Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan Metode Difusi Sumuran (Greenwood, 1995)

1. Campurkan suspensi bakteri secara merata ke dalam cawan petri steril yang telah diberi media *Nutrient Agar* (NA). Dibiarkan hingga memadat.
2. Selanjutnya, media *Nutrient Agar* (NA) yang telah memadat diberi bentukan sumuran dengan diameter $\pm 6\text{mm}$ sebanyak 8 sumuran.
3. Setelah didapatkan bentukan sumuran pada media *Nutrient Agar* (NA), kemudian teteskan konsentasi ekstrak yang akan diuji, yaitu 12,5%, 25%, 50%, 75% dan

- 100%, chlorhexidine gluconate 0,2% sebagai kontrol positif, dan akuades sebagai kontrol negatif kedalam sumuran tersebut.
4. Selanjutnya, media NA diinkubasi dalam inkubator dengan suhu kamar 37°C selama 48 jam dalam suasana anaerob.
 5. Setelah 48 jam, dilakukan pengukuran zona terang pada konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh yang diukur dengan menggunakan jangka sorong (Bussmann *et al.*, 2011). Menurut Ahn dkk dalam buku Greenwood (1995) klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri adalah sebagai berikut:

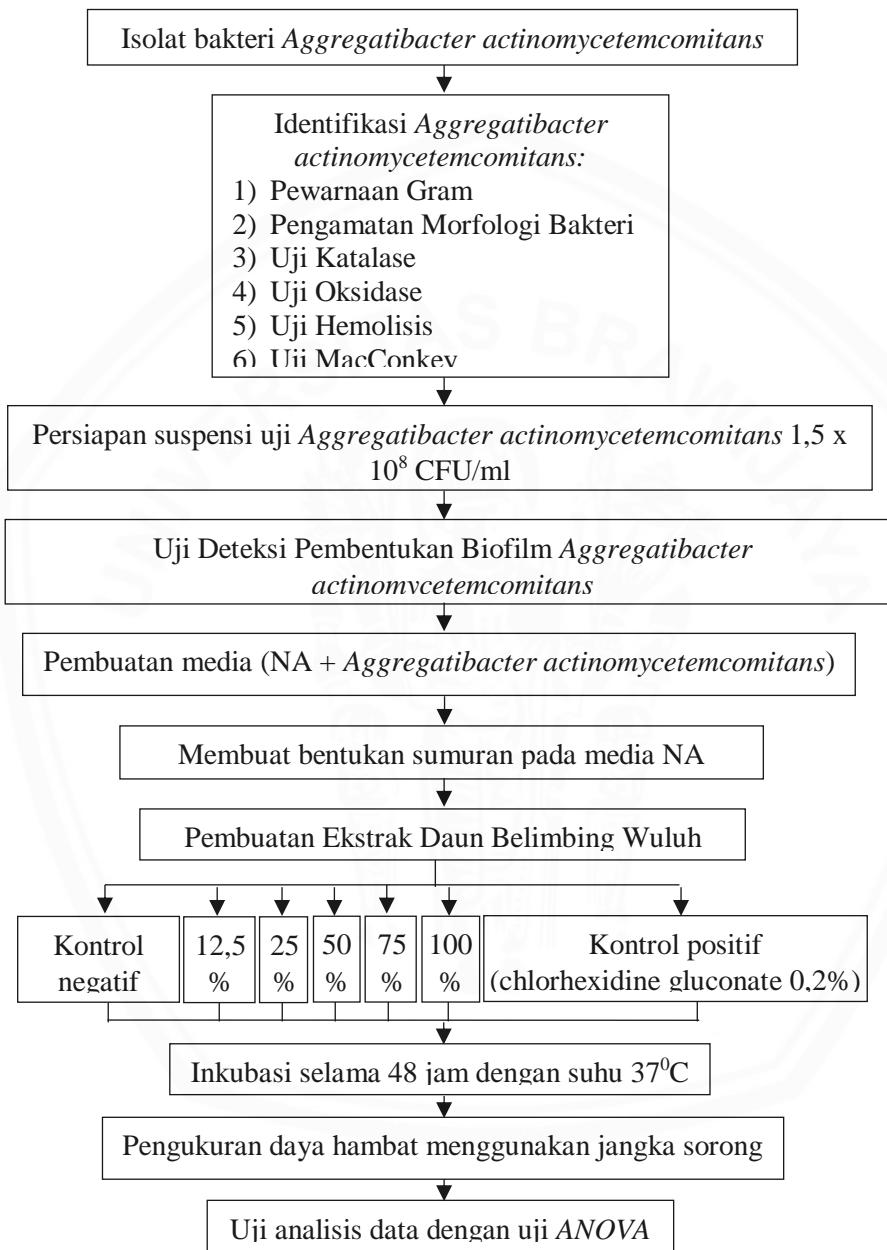
Tabel 4.1 Klasifikasi Respon Hambat Pertumbuhan Bakteri (Greenwood, 1995)

Diameter Zona Terang	Respon Hambat Pertumbuhan Bakteri
≤ 10 mm	Tidak aktif
11-15 mm	Lemah
16-20 mm	Sedang
≥ 20 mm	Kuat

4.9 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan uji Shapiro-Wilk dikarenakan jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50, yaitu 24 sampel. Apabila data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap jumlah koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap jumlah koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Analisis data menggunakan program SPSS versi 20.

4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Ekstraksi daun belimbing wuluh menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol menghasilkan hasil ekstrak berwarna hijau tua. Ekstrak etanol daun belimbing wuluh berbentuk cairan agar dapat larut dalam aquades. Sebanyak 200 gram serbuk daun belimbing wuluh dapat menghasilkan 36,44 gram ekstrak etanol daun belimbing wuluh. Hasil ekstraksi terlampir pada lampiran 2.

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang telah disediakan oleh laboratorium Mikrobiologi Universitas Airlangga. Sebelum melakukan identifikasi, sediaan isolat koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang berasal dari laboratorium dibiakkan terlebih dahulu dengan melakukan *streaking* pada medium NA (*Nutrient Agar*) dan kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C dan kemudian dilakukan identifikasi.

Hasil kultur menunjukkan isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menghasilkan koloni yang berwarna putih, tembus pandang, tepi irreguler, permukaan kasar dan melekat pada agar. Untuk membuktikan bahwa koloni yang digunakan dalam penelitian adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* maka dilakukan tes konfirmasi dengan lima cara yaitu pewarnaan gram, uji hemolisis, uji agar MacConkey, uji katalase, dan uji oksidase. Kemudian dilakukan uji deteksi pembentukan biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menggunakan metode *tube-test*.

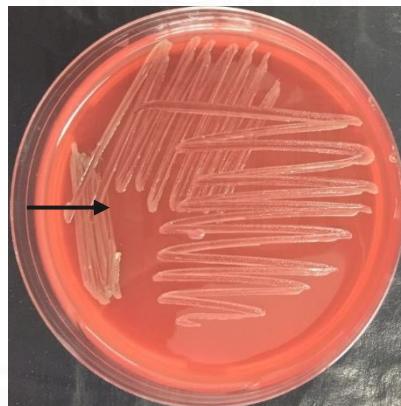
Pada pewarnaan gram dilakukan pengecatan pada bakteri dan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Didapatkan gambaran sel berbentuk kokobasilus, yaitu perpaduan antara bentuk bulat dan batang yang berwarna kemerahan yang menunjukkan sifat gram negatif seperti pada Gambar 5.1.



Gambar 5.1 Pewarnaan Gram *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Keterangan: tanda panah menunjukkan bentukan kokobasilus berwarna kemerahan

Setelah melakukan identifikasi dengan pewarnaan gram maka dilanjutkan uji Hemolisis dengan melakukan kultur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebanyak satu ose dalam agar darah kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diamati morfologi koloni yang terbentuk dan didapatkan adanya zona jernih disekitar koloni bakteri. Hal ini tampak pada Gambar 5.2.

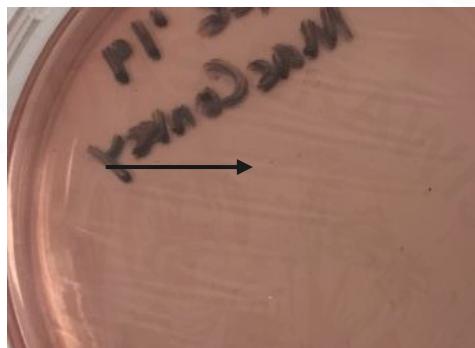


Gambar 5.2 Uji Hemolisis

Keterangan: tanda panah menunjukkan adanya gambaran zona jernih

Setelah melakukan uji hemolisis, dilanjutkan dengan uji agar MacConkey. Uji agar MacConkey dilakukan dengan menginkubasi koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebanyak satu ose kedalam media agar MacConkey selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Kemudian dilakukan pengamatan dan didapatkan hasil yang negatif yaitu koloni tumbuh tidak berwarna atau jernih. Hal ini tampak pada gambar 5.3.

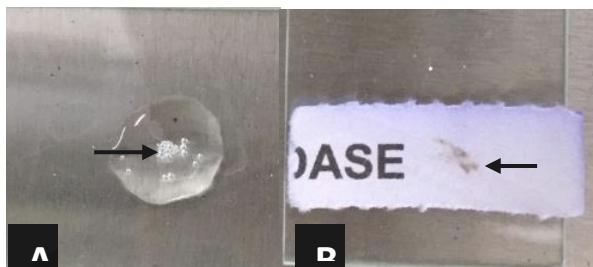


Gambar 5.3 Uji Agar MacConkey

Keterangan: tanda panah menunjukkan gambaran koloni yang jernih

Kemudian dilanjutkan dengan uji katalase. Uji katalase dilakukan dengan menginokulasikan satu ose koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada kaca preparat. Selanjutnya ditetes dengan H₂O₂ 15% sebanyak satu tetes dan diamati hasilnya. Pada uji ini didapatkan hasil yang positif berupa pembentukan gelembung yang menandakan bakteri bersifat anaerob. Hal ini tampak pada gambar 5.4.

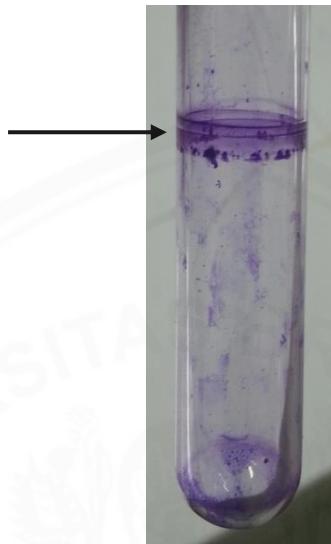
Setelah dilakukan uji katalase, kemudian dilanjutkan dengan melakukan uji oksidase dengan cara menginokulasikan satu ose koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada kertas filter yang telah direndam dengan substrat *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydchloride* selama 10-30 detik dan diamati perubahan warna yang ada. Pada uji ini, didapatkan hasil positif yaitu terdapat perubahan warna menjadi ungu pada kertas reagen oksidase. Hal ini tampak pada gambar 5.4.



Gambar 5.4 A. Uji Katalase, B. Uji Oksidase

Keterangan: A. Tanda panah menunjukkan pembentukan gelembung, B. Tanda panah menunjukkan perubahan warna kertas reagen oksidase menjadi warna ungu.

Setelah semua uji identifikasi selesai dilakukan, dilanjutkan dengan uji deteksi pembentukan biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan cara menginokulasikan satu ose *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kedalam 10mL media *trypticase soy broth* yang ditambahkan 1% glukosa pada tabung reaksi. Kemudian tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, tabung reaksi dicuci menggunakan *phosphate buffer saline* dan dikeringkan. Tabung reaksi diberi pewarna kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang. Kemudian amati formasi biofilm yang terbentuk pada dinding tabung reaksi. Pada uji deteksi ini, didapatkan formasi biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang ditandai dengan adanya cincin berwarna ungu kebiruan pada dinding tabung. Hal ini tampak pada gambar 5.5.

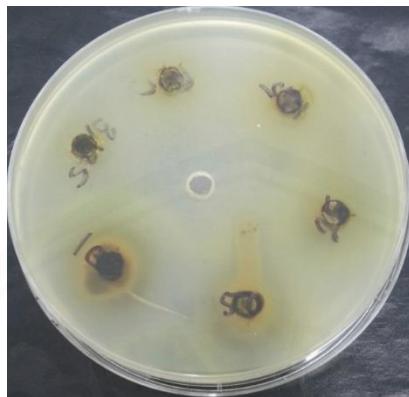


Gambar 5.5 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Keterangan: A. Tanda panah menunjukkan pembentukan formasi biofilm berupa cincin yang berwarna ungu kebiruan

5.1.1 Hasil Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh yang akan digunakan pada penelitian ini. Penelitian pendahuluan dengan metode difusi sumuran menggunakan suspensi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang disetarkan dengan standar *Mc Farland* 0,5 yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/mL serta ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 0%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%. Hasil penelitian menunjukkan pada konsentrasi 0%; 3,125%; 6,25%; 12,5% tidak terbentuk zona jernih di sekitar lubang sumuran pada media *Nutrient agar* (NA). Zona jernih baru mulai terbentuk pada konsentrasi 25%; 50%; 100% sebagaimana terlihat pada gambar 5.6.



Gambar 5.6 Uji Pendahuluan

Pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada konsentrasi 0% (kontrol negatif) menunjukkan bahwa suspensi bakteri yang digunakan pada kelompok perlakuan benar-benar mengandung bakteri. Kemudian dilakukan perapatan konsentrasi, didapatkan konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh 12,5%; 25%; 50%; 75%; 100% dan kemudian dilakukan pengulangan sebanyak empat kali.

5.1.2 Hasil Penelitian Pengulangan

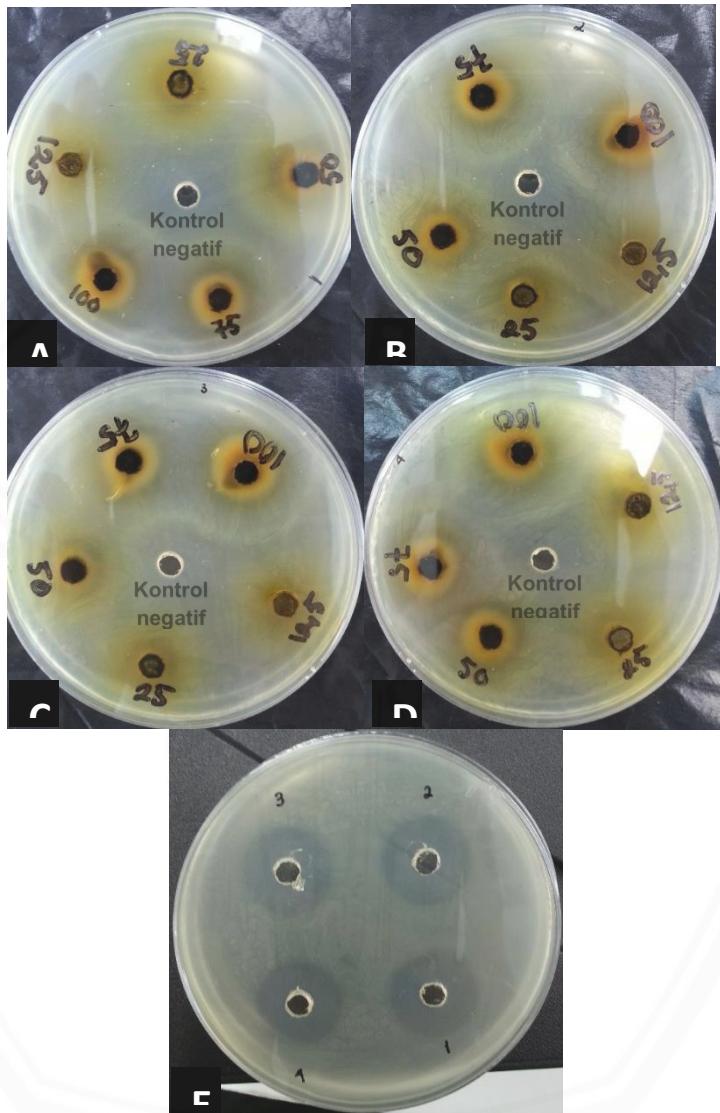
Penelitian pengulangan dilakukan menggunakan ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 12,5%; 25%; 50%; 75%; 100%. Penentuan hasil dilakukan dengan cara mengukur diameter zona jernih yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 5.1 dan Gambar 5.7.

KONSENTRASI (%)	DIAMETER ZONA HAMBAT (mm)				
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3	Pengulangan 4	Rata-Rata
12,5	6	6	6	6	6
25	13	13,7	12,9	12,9	13,125
50	17	17	15,1	17,2	16,575
75	20	20	17,7	20	19,425
100	22	22	20,6	21,5	21,525
Kontrol positif	21,3	21,3	20,8	20,9	21,075
Kontrol negatif	6	6	6	6	6

Tabel 5.1. Hasil Penelitian Pengulangan

Keterangan: Kontrol negatif berupa aquades steril

Kontrol positif berupa Chlorhexidine gluconate 0,2%



Gambar 5.7 Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Menggunakan Metode Difusi Sumuran dengan Berbagai Konsentrasi (12,5%, 25%, 50%, 75%, 100%, Kontrol Negatif dan Kontrol Positif).

Keterangan: A: Pengulangan 1. B: Pengulangan 2. C: Pengulangan 3. D: Pengulangan 4. E: Kontrol Positif.

5.2 Hasil Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis dengan software SPSS 20 dan output hasil analisis dapat dilihat pada lembar lampiran. Uji statistik yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Uji Normalitas

Penelitian ini menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dikarenakan jumlah sampel yang digunakan kurang dari 50, yaitu 28 sampel. Didapatkan nilai signifikansi 0,105 ($p>0,05$) yang menunjukkan distribusi data normal sehingga digunakan uji analisis parametrik. Hasil uji normalitas dapat dilihat pada lampiran 3.

2. Uji Homogenitas

Sebelum dilakukan uji One Way Anova maka dilakukan uji homogenitas terlebih dahulu untuk mengetahui apakah varian sampel pada semua perlakuan sama atau terdapat perbedaan. Hipotesis ditegakkan melalui H_0 dan H_1 . H_0 diterima bila nilai signifikansi yang diperoleh lebih dari 0,05 ($p>0,05$), sedangkan H_0 ditolak bila nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p<0,05$). H_0 dari penelitian ini adalah sampel pada setiap perlakuan sama (homogen). H_1 diartikan sebagai sampel pada setiap perlakuan tidak sama (heterogen).

Berdasarkan hasil uji homogenitas, terlihat signifikansi sebesar 0,250 ($p>0,05$) sehingga H_0 diterima dan dapat diinterpretasikan bahwa sampel pada setiap perlakuan sama (homogen). Hasil uji homogenitas dapat dilihat pada lampiran 4.

3. Uji One-way ANOVA

Uji *One-way ANOVA* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap jumlah koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Berdasarkan hasil uji *One-way ANOVA*, terlihat signifikansi sebesar 0,000 ($p<0,05$) sehingga dapat diinterpretasikan bahwa terdapat pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap jumlah koloni *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans. Hasil uji *One-way ANOVA* dapat dilihat pada lampiran 5.

4. Uji *Post Hoc*

Uji *Post Hoc* digunakan untuk mengetahui perbandingan berganda (*multiple comparison*) antara setiap perlakuan dan dapat dilihat pada lampiran 6. Hasil uji *Post Hoc* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada diameter zona hambat pertumbuhan koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* antara setiap kelompok perlakuan.

5. Uji Korelasi-Regresi

Uji Korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan dari pemberian ekstrak etanol daun belimbing wuluh sebagai antibakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Hasil uji korelasi Spearman dapat dilihat pada lampiran 7.

Berdasarkan hasil uji korelasi-regresi, dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak etanol daun belimbing wuluh sebagai antibakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ($R=0,952$, $p=0,000$) mempunyai hubungan (korelasi) yang kuat dan signifikan ($p<0,05$) dengan arah korelasi positif. Korelasi positif menunjukkan arah korelasi berbanding lurus. Artinya, semakin meningkat konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh, maka diameter zona hambat yang terbentuk semakin meningkat.

Koefisien korelasi sebesar 0,952 menunjukkan bahwa kontribusi pemberian ekstrak etanol daun belimbing wuluh dalam menurunkan pertumbuhan koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebesar 90,6% didapatkan dari $R^2 \times 100\%$, sedangkan sisa sebesar 9,4% disebabkan oleh faktor-faktor lain yang tidak diteliti.

BAB 6

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa efek ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang dilihat dari terbentuknya zona hambat pertumbuhan koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada media *Nutrient Agar* (NA). Hal ini dapat disebabkan karena adanya senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun Belimbing wuluh yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tanin. Keempat senyawa ini diduga mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Valsan and Raphael, 2016).

Senyawa flavonoid termasuk golongan fenol yang memiliki efek anti bakteri. Senyawa fenol bekerja dalam sel dengan merusak membran sel sehingga terjadi perubahan permeabilitas sel yang dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau kematian sel. Senyawa fenol juga dapat mendenaturasi protein sel dan mengerutkan dinding sel sehingga dinding sel bakteri menjadi lisis. Dinding sel bakteri yang rusak menyebabkan tidak adanya cadangan energi sehingga pertumbuhan bakteri terhambat (Kumalasari dan Sulistyani, 2011).

Senyawa saponin yang terkandung dalam ekstrak etanol daun belimbing wuluh memiliki efek anti bakteri dengan mekanisme menurunkan tegangan permukaan membran sterol dari dinding sel *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Tegangan permukaan membran yang turun akan mempengaruhi permeabilitas membran sehingga berdampak pada proses pengangkutan dan biosintesis dinding sel. Hal ini akan menyebabkan pertumbuhan sel bakteri terhambat hingga menyebabkan kematian sel (Barile *et al.*, 2007).

Senyawa tanin merupakan senyawa turunan fenol yang bersifat lipofilik sehingga mudah terikat pada dinding sel dan menyebabkan kerusakan dinding sel. Selain itu tanin dapat menghambat sintesis kitin yang merupakan komponen penting dinding sel bakteri. Sintesis kitin yang terhambat menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat dan akan berpengaruh pada pertumbuhan sel bakteri (Purwita dkk., 2013).

Senyawa alkaloid dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut.

Mekanisme lain antibakteri alkaloid yaitu komponen alkaloid diketahui sebagai interkelator DNA dan menghambat enzim *topoisomerase* sel bakteri (Ozcelik *et al.*, 2007).

Berdasarkan klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri oleh Ahn dkk dalam buku Greenwood (1995), ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) pada konsentrasi 12,5% tidak cukup kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri karena diameter zona hambat yang didapatkan ≤ 10 mm , sedangkan rata-rata zona hambat pada konsentrasi 12,5% hanya sebesar 6 mm, sehingga dinyatakan tidak aktif. Pada konsentrasi 25% didapatkan rata-rata diameter zona hambat dalam kategori 11-15 mm, yaitu sebesar 13,12% dan dikategorikan memiliki respon hambat yang lemah, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi 25%, ekstrak etanol daun belimbing wuluh sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Hasil analisis penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun belimbing wuluh sebagai anti bakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* mempunyai hubungan (korelasi) yang kuat dan signifikan dengan arah korelasi positif. Korelasi yang kuat dan signifikan memiliki arti bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh memiliki efek anti bakteri yang kuat sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri serta kemampuan hambat dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh terus meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak yang diberikan. Hal ini dibuktikan dengan didapatkan efek anti mikroba pada konsentrasi ekstrak 25% yang memiliki arti pada konsentrasi 25%, ekstrak etanol daun belimbing wuluh sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan efek dari pemberian ekstrak etanol daun belimbing wuluh terus meningkat seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak itu sendiri. Korelasi positif menunjukkan arah korelasi berbanding lurus. Artinya, semakin meningkat konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh, maka diameter zona hambat yang terbentuk semakin meningkat. Pada konsentrasi ekstrak 12,5% diduga efek anti bakteri yang ditimbulkan tidak cukup kuat sehingga tidak ditemukan zona hambat pertumbuhan bakteri, namun pada konsentrasi ekstrak 100% didapatkan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang kurang lebih sama dengan

diameter zona hambat pada kontrol positif, yaitu chlorhexidine gluconate 0,2%.

Penelitian dengan menggunakan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* telah dilakukan dengan berbagai macam bahan. Penelitian yang dilakukan Maisarah (2015) menggunakan ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) diperoleh konsentrasi minimum untuk membunuh *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada konsentrasi 25% menggunakan metode dilusi tabung. Penelitian lain yang dilakukan oleh Ayu dkk (2014) menunjukkan bahwa *flavonoid*, *tanin*, dan *triterpenoid* yang terkandung dalam ekstrak daun jambu mete (*Anacardium occidentale l.*) dapat menghambat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada konsentrasi 16% dengan diameter zona hambat 12,04 mm menggunakan metode difusi cakram. Dari kedua penelitian diatas, dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh memiliki efek antibakteri yang relatif sama dengan ekstrak buah belimbing wuluh, tetapi ekstrak daun belimbing wuluh memiliki efek antibakteri yang lebih lemah dibandingkan dengan ekstrak daun jambu mete jika diujikan pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Penelitian lain juga dilakukan Pendid dkk (2016) menggunakan uji profil fitokimia ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) pada *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diperoleh KHM (Kadar Hambat Minimum) dengan diameter zona hambat sebesar 13,13mm dan 8,63 mm. Sedangkan penelitian oleh Amalia (2015) yang menggunakan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* dengan metode difusi cakram menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak 30%, terbentuk diameter zona hambat sebesar 11,3 mm. Penelitian lain oleh Zakaria *et.al.* (2007) yang menggunakan ekstrak kloroform dan ekstrak akueus daun belimbing wuluh menunjukkan bahwa ekstrak tersebut lebih efektif terhadap bakteri gram positif seperti *S. aureus*, *B. cereus*, *K. rhizophila*, *S. epidermidis* dan *C. diphtheriae* dibandingkan dengan bakteri gram negatif seperti *A. hydrophila*, *P. vulgaris*, *S. typhi*, dan *C. fuendii*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) dapat menghambat pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara optimal pada konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh 25%. Pada

konsentrasi ini sudah terdapat zona hambat pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada media *Nutrient agar* (NA) dan kemampuan ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) dalam menghambat *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebesar 90,6%.

BAB 7 **PENUTUP**

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dalam penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) memiliki efek anti bakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*.
2. Ekstrak etanol belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) memiliki efek anti bakteri terhadap bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* terlihat mulai konsentrasi 25%.
3. Terdapat hubungan yang kuat antara pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) dengan konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh mengakibatkan penurunan pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada media NA.

7.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan yang telah dikemukakan maka diberikan saran-saran untuk mengadakan perbaikan di masa mendatang, yaitu sebagai berikut:

1. Diperlukan pengujian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui dosis efektif, dosis toksik, dan efek samping sebelum dilanjutkan dengan pengujian pada manusia untuk keperluan pengobatan medis pada masyarakat luas.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai efek daun belimbing wuluh sebagai anti bakteri terhadap bakteri lain selain *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa aktif dari daun belimbing wuluh dengan metode selain maserasi dan dapat dilakukan pembandingan antara kedua metode tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Alhassan AM dan Ahmed QU. 2016. *Averrhoa bilimbi Linn.: A review of its ethnomedicinal uses, phytochemistry, and pharmacology.* *Journal of Pharmacy & BioAllied Science*, 8(4): 265-271.
- Amalia IR. 2015. *Perbandingan Efek Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) dan Ekstrak Daun Sirih (Piper betle L.) dalam Menghambat Pertumbuhan Enterococcus faecalis.* Skripsi. Banda Aceh: Universitas Syiah Kuala.
- Armitage GC dan Cullinan MP. 2010. Comparison Of The Clinical Features Of Chronic and Aggressive Periodontitis. *Periodontology 2000*, 53(1): 12-27.
- Ayu ND, Indraswary R, Christiono S. 2014. Efektivitas Ekstrak Daun Jambu Mete (*Anacardium occidentale* L.) terhadap Pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada Gingivitis – In Vitro. *Odonto Dental Journal*, 1(1): 44-48.
- Balashova NV, Crosby JA, Ghofaily LA, Kachlany SC. 2006. Leukotoxin Confers Beta-Hemolytic Activity to *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity*, 74(4): 2015-2021
- Bostancı N dan Belibasakis GN. 2012. *Porphyromonas gingivalis: An Invasive and Evasive Opportunistic Oral Pathogen.* *FEMS Microbiol*, 333: 1-9.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2013. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology 26th Edition.* New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Brown AE dan Smith H. 2015. *Benson's Microbiological Application.* Columbus: McGraw-Hill Education.
- Bussmann RW, Malca-Garcia G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Diaz D, Pourmand K, Jonat B, Somogy S, Guardado G, Aguirre C, Chan R, Meyer K, Kuhlman A, Townesmith A, Effio-Carbajai J, Frias-Fernandez F, Benito M. 2011. Minimum Inhibitory Concentrations of Medicinal Plants Used in Northern Peru as Antibacterial Remedies. *Journal Ethnopharmacol*, 132(1): 101-8

- Chamanrokh P, Assadi MM, Noohi A, Yahyai. 2008. Emulsan Analysis Produced By Locally Isolated Bacteria and *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *Iran Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 5(2): 101-8
- Creanor S. 2016. *Essential Clinical Oral Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Das SC, Sultana S, Roy S, Hasan SS. 2011. Antibacterial and Cytotoxic Activities of Methanolic Extract of Leaf and Fruit Part of The Plant *Averrhoa bilimbi* (Oxalidaceae). *American Journal of Scientific and Industrial Research*, 2(4): 531-6.
- Forbers BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 2007. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 12th Edition*. St. Louis: Mosby.
- Greenwood. 1995. *Antibiotics Susceptibility (Sensitivity) Test, Antimicrobial Ant Chemotherapy*. San Fransisco: Addison Westley Longman Inc.
- Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD. 2008. *Extraction Technologies For Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: International Centre For Science and High Technology 2.
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. 2011. Evaluation of Different Detection Methods of Biofilm Formation in The Clinical Isolates. *Braz J Infect Dis*, 15(4): 305-311.
- Henderson B, Ward JM, Ready D. 2010. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: A Triple a Periodontopathogen. *Periodontology 2000*, 54: 78-105.
- Jorgensen J dan Ferraro MJ. 2009. Antibiotic Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology*, 9(49): 1749-55. <http://cid.oxfordjournals.org>, diakses tanggal 7 Mei 2017.
- Kachlany SC. 2010. Aggregatibacter actinomycetemcomitans Leukotoxin From Threat to Therapy. *Journal of Dental Research*, 89(6): 561-70.
- Kango N. 2010. *Textbook of Microbiology*. New Delhi: I. K. International Pvt Ltd.
- Karlina CY, Ibrahim M, Trimulyono G. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herba Krokot (*Portulaca oleracea L.*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Lentera Bio*, 2(1): 87-93.

- Karou, Damintoti. Savadogo. Aly. 2005. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*, 4(12): 1452-1457.
- Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas)*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kementerian Pertanian Badan Penyuluhan dan Pengembangan Sumber Daya Manusia Pertanian. 2015. *Mengenal Manfaat 'Belimbing Wuluh' dan Trik Budidayanya*. <http://cybex.pertanian.go.id/materilokalita/detail/11250/mengenal-manfaat-belimbing-wuluh-dan-trik-budidayanya>, diakses tanggal 7 Mei 2017.
- Kesic L, Petrovic M, Obradovic R, Pejcic A. 2009. The Important of Aggregatibacter actinomycetemcomitans in Etiology of Periodontal Disease. *Acta Medica Medianae*, 48(3): 35-7.
- Kinane DF dan Mombelli A. 2012. *Periodontal Disease*. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers.
- Kler S dan Malik R. 2010. An Update on the virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* – A Systematic Review. *A Journal of Dentistry*, 1(1): 1-10.
- Kumalasari E dan Sulistyani N. 2011. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredea cordifolia* (Tenore) Steen). Terhadap *Candida albicans* serta Skrining Fitokimia. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 1(2): 51-62.
- Kumboyono. 2011. Perbedaan Efek Penyuluhan Kesehatan Menggunakan Media Cetak dengan Media Audio Visual Terhadap Peningkatan Pengetahuan Pasien Tuberkulosis. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Keperawatan No. 7 Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya*.
- Lamothe RG, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F, Bouarab K. 2009. Plant Antimicrobial Agent and Their Effect On Plant and Human Pathogens. *International Journal Of Molecular Science*, 10: 3400-19.
- Lathifah, QA. 2008. *Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) dengan Variasi Pelarut*. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Malang.

- Lely MA. 2004. Pengaruh Kadar Glukosa Darah yang Terkontrol Terhadap Penurunan Derajat Kegoyahan Gigi Penderita Diabetes Melitus di RS Persahabatan Jakarta. *Media Litbang Kesehatan XIV(3)*.
- Liantari DS. 2014. Effect Of Wuluh Starfruit Leaf Extract For *Streptococcus mutans* Growth. *Journal Majority*, 3(7): 27.
- Macinnes JL dan Lally ET. 2006. The Genus *Actinobacillus*. *Prokaryotes*, 6: 1096-1118.
- Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. 2014. *Textbook Of Diagnostic Microbiology*. Amsterdam: Elsevier Health Science.
- Maisarah. 2015. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi) terhadap Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Skripsi. Banda Aceh: Universitas Syiah Kuala.
- Manson JD dan Eley BM. 2012. Outline of Periodontics. *Buku Ajar Periodonti*, Anastasia S (penterjemah), 2013. Jakarta: EGC.
- Matangkasombut O, Wattanawaraporn R, Keiko T, Masaru O, Motoyuki S, Mongkolsuk S. 2010. Cytolethal Distending Toxin from Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces DNA Damage, sIg2 Cell Cycle Arrest, and Caspase Independent Death In A *Saccharomyces cerevisiae* model. *Infection and Immunity*, 78(2): 783-92.
- Moran R. 2011. *Oxalidaceae : Averrhoa bilimbi*. http://www.plantsystematics.org/imgs/robbin/r/Oxalidaceae_Averrhoa_bilimbi_38973.html, diakses 7 September 2017.
- Mukhlisoh W. 2010. *Pengaruh Ekstrak Tunggal dan Gabungan Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi Linn) Terhadap Efektifitas Antibakteri Secara In Vitro*. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Ibrahim.
- Mythireyi D dan Krishnababa. 2012. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, an aggressive oral bacteria- a review. *International Journal of Health Sciences & Research*, 2:105-17.
- Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. 2015. *Carranza's Clinical Periodontology 12th Edition*. Canada: Elsevier.
- Norskov-Lauritsen N dan Kilian M. 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus*

- aphrophilus, *Haemophilus paraphrophilus* and *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-dependent and V factor independent isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2135-46.
- Nurdina YA, Praharani D, Ermawati T. 2012. Daya Hambat Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia*) Terhadap *Lactobacillus acidophilus*. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*.
- Noack B dan Hoffman T. 2004. Aggressive Periodontitis. *Clinical and Research Reports*, 1(4): 335-44.
- Obiechina M. 2011. *Understanding Periodontitis: A Comprehensive Guide To Periodontal Disease For Dentist, Dental Hygienists, and Dental Patients*. Bloomington: Author House.
- Ozcelik B, Kartal M, Orhan I. 2011. Cytotoxicity, Antiviral and Antimicrobial Activities of Alkaloids, Flavonoids, and Phenolic Acids. *Pharmaceutical Biology Journal*. 47(4): 396-402.
- Paino A. 2013. Virulence Properties Of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Biofilm And Characterisation Of Its Putative Cytokine Exploitation. *Turki Turun Yliopiston Julkaisuja Annales Universitatis Turkuensis*.
- Pendit PACD, Zubaidah E, Sriherfyna FH. 2016. Karakteristik Fisik-Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 4(1): 400-9.
- Periasamy S and Kolenbrander P. 2009. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Builds Mutualistic Biofilm Communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* Species in Saliva. *Infection and Immunity*, 77(9): 3542-3551.
- Purwaningsih dan Eko. 2007. *Multiguna Belimbing Wuluh*. Jakarta: Ganeca Exact.
- Reddy S. 2014. *Essential Of Clinical Periodontology and Periodontics*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Purwita AA, Indah NK, Trimulyono G. 2013. Penggunaan Ekstrak Daun Srikaya (*Annona squamosa*) sebagai Pengendali Jamur

- Fusarium oxysporum* secara In Vitro. *Lentera Bio* 2(2): 179-183.
- Slots J, Ting M. 2007. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontology 2000* 20(1); 7-13.
- Sriraman P, Mohanraj R, Neelakantan P. 2014. Aggregatibacter *actinomycetemcomitans* In Periodontal Disease. *Research Journal Of Pharmaceutical Biological and Chemical Science*, 5(2): 406.
- Tarver T. 2009. Biofilms: A Treat to Food Safety. *Food Technology*, 63(2): 46-52.
- Tille P. 2015. *Bailey& Scott's Diagnostic Microbiology*. Amsterdam: Elsevier Health Science.
- Tsuzukubashi O, Takada K, Saito M, Kimura C, Yoshikawa T, Makimura M. 2008. A Novel Selective Medium For Isolation Of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Journal Of Periodontal Research*, 43: 544-548.
- Utami ER. 2012. Antibiotika, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *Saintis*, 1(1); 124-38.
- Valsan A dan Raphael KR. 2016. Pharmacognostic Profile of *Averrhoa bilimbi* Linn. Leaves. *South Indian Journal Of Biological Science*, 2(1).
- Vandersall DC. 2013. *Concise Encyclopedia of Periodontology*. Blankwell Munksgaard.
- Zakaria ZA, Zaiton H, Henie EFP, Jais AMM, Zainuddin ENHE. 2007. In vitro Antibacterial Activity of *Averrhoa bilimbi* L. Leaves and Fruits Extracts. *International Journal of Tropical Medicine*, 2(3): 96-100.
- Zamora LL dan Perez-Garcia MT. 2011. Using Digital Photography to Implement The McFarland Method. *Journal R. Soc Interface*, 9(73): 1892-7.
- Zhang DF, Li K, Zhou MH. 2011. Epimedium Herb Extract Intervening In Hypothalmic-Pituitary-Testicular Axis Of Male Ratts In Delayed Puberty Caused By Diet-Induced Obesity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(3).

Lampiran 1

Determinasi Tanaman Belimbing Wuluh

 <p>DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR UPT MATERIA MEDICA Jalan Labor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313) KOTA BATU</p>																								
<p>Nomor : 074 / 48A / 102.7 / 2017 Sifat : Biasa Perihal : <u>Determinasi Tanaman Belimbing Wuluh</u></p> <p>Memenuhi permohonan saudara :</p> <p>Nama : FRANKLYN CRISTEVAN NICOLAS NIM : 145070400111009 Instansi : FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG</p> <p>1. Perihal determinasi tanaman belimbing wuluh</p> <table> <tr> <td>Kingdom</td> <td>: Plantae</td> </tr> <tr> <td>Sub Kingdom</td> <td>: Tracheobionta (berpembuluh)</td> </tr> <tr> <td>Super Divisi</td> <td>: Spermatophyta</td> </tr> <tr> <td>Divisi</td> <td>: Magnoliophyta</td> </tr> <tr> <td>Sub divisi</td> <td>: Angiospermae</td> </tr> <tr> <td>Kelas</td> <td>: Dicotyledoneae</td> </tr> <tr> <td>Bangsa</td> <td>: Geraniales</td> </tr> <tr> <td>Suku</td> <td>: Oxalidaceae</td> </tr> <tr> <td>Marga</td> <td>: Averrhoa</td> </tr> <tr> <td>Jenis</td> <td>: <i>Averrhoa bilimbi</i> L.</td> </tr> <tr> <td>Nama Daerah</td> <td>: Limeng, selimeng, thlimeng (Ach); selemeng (Gayo); asom, belimbing, balimbining (Batak); malimbi (Nias); balimbieng (Minangkabau); belimbing asam (Melayu); Belimbing (Lampung); calincing, balingbing (Sunda); belimbing wuluh (Jawa); bhalingbing bulu (Madura); blingbing buloh (Bali); limbi (Bima); balimbeng (Flores); libi (Sawu); berlerang (Sangi).</td> </tr> <tr> <td>Kunci Determinasi</td> <td>: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-219b-220b-224b-225b-225b-227b-229b-230b-234b-235b-236b-237b-238b-1b-1a.</td> </tr> </table> <p>2. Morfologi : Habisus: Pohon, tinggi 5-10 m. Batang: Tegak, bercabang-cabang, permukaan kasar, banyak tonjolan, hijau kotor. Daun: Majemuk, menyirip, anak daun 25-45 helai, bulat telur, ujung meruncing, pangkal membulat, panjang 7-10 cm, lebar 1-3 cm, bertangkai pendek, pertulangan menyirip, hijau muda, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk malai, pada tonjolan batang dan cabang, menggantung, panjang 5-20 cm, kelopak ± 6 mm, merah, daun mahkota bergandengan, bentuk lanset, ungu. Buah: Buni, bulat, panjang 4-6 cm, hijau kekuningan. Biji: Lanset atau segi tiga, masih muda hijau setelah tua kuning kehijauan. Akar: Tunjang, coklat kehitaman.</p> <p>3. Nama Simpilia : Bilimbi Folium/ Daun Belimbing Wuluh.</p> <p>4. Kandungan : Batang mengandung saponin, tanin, glukosida, kalsium oksalat, sulfur, asam formic, peroksidae. Daun mengandung tanin, sulfur, asam formic, peroksidae, kalsium oksalat, kalium sitrat, flavonoid, pektin, asam galat, dan asam ferulat. Daun, buah, dan batang mengandung saponin, flavonoida. Daunnya juga mengandung tanin dan batangnya mengandung alkaloida dan polifenol.</p> <p>5. Penggunaan : Penelitian.</p> <p>6. Daftar Pustaka</p> <ul style="list-style-type: none"> Anonim. http://www.plantamor.com/belimbing_wuluh, diakses tanggal 11 Desember 2010. Anonim. http://www.tanamanobat.com/belimbing_asam, diakses tanggal 21 Oktober 2010. Anonim. http://www.warintek.ristek.go.id/belimbing_wuluh, diakses tanggal 23 Oktober 2010. Van Steenis, CGGJ. 2008. <i>FLORA: untuk Sekolah di Indonesia</i>. Pradnya Paramita, Jakarta. <p>Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.</p> <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">  <p>RENCANA KEGIATAN PROVINSI JAWA TIMUR Januari 2018 Kepala UPT MATERIA MEDICA BALI MULYA M. Mellaene ERNAWATI, R.M., Drs., Apt., M.Kes. NIP. 19611102 199103 1 003</p> </div>	Kingdom	: Plantae	Sub Kingdom	: Tracheobionta (berpembuluh)	Super Divisi	: Spermatophyta	Divisi	: Magnoliophyta	Sub divisi	: Angiospermae	Kelas	: Dicotyledoneae	Bangsa	: Geraniales	Suku	: Oxalidaceae	Marga	: Averrhoa	Jenis	: <i>Averrhoa bilimbi</i> L.	Nama Daerah	: Limeng, selimeng, thlimeng (Ach); selemeng (Gayo); asom, belimbing, balimbining (Batak); malimbi (Nias); balimbieng (Minangkabau); belimbing asam (Melayu); Belimbing (Lampung); calincing, balingbing (Sunda); belimbing wuluh (Jawa); bhalingbing bulu (Madura); blingbing buloh (Bali); limbi (Bima); balimbeng (Flores); libi (Sawu); berlerang (Sangi).	Kunci Determinasi	: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-219b-220b-224b-225b-225b-227b-229b-230b-234b-235b-236b-237b-238b-1b-1a.
Kingdom	: Plantae																							
Sub Kingdom	: Tracheobionta (berpembuluh)																							
Super Divisi	: Spermatophyta																							
Divisi	: Magnoliophyta																							
Sub divisi	: Angiospermae																							
Kelas	: Dicotyledoneae																							
Bangsa	: Geraniales																							
Suku	: Oxalidaceae																							
Marga	: Averrhoa																							
Jenis	: <i>Averrhoa bilimbi</i> L.																							
Nama Daerah	: Limeng, selimeng, thlimeng (Ach); selemeng (Gayo); asom, belimbing, balimbining (Batak); malimbi (Nias); balimbieng (Minangkabau); belimbing asam (Melayu); Belimbing (Lampung); calincing, balingbing (Sunda); belimbing wuluh (Jawa); bhalingbing bulu (Madura); blingbing buloh (Bali); limbi (Bima); balimbeng (Flores); libi (Sawu); berlerang (Sangi).																							
Kunci Determinasi	: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208b-219b-220b-224b-225b-225b-227b-229b-230b-234b-235b-236b-237b-238b-1b-1a.																							

Lampiran 2
Ekstrak Daun Belimbing Wuluh



Lampiran 3

Uji Normalitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Diameter Zona Hambat	.165	28	.050	.939	28	.105

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 4

Uji Homogenitas

Descriptives

Diameter Zona Hambat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K Neg	4	6.000	.0000	.0000	6.000	6.000	6.0	6.0
K Pos	4	21.000	.2160	.1080	20.656	21.344	20.8	21.3
12.5%	4	6.000	.0000	.0000	6.000	6.000	6.0	6.0
25%	4	13.125	.3862	.1931	12.510	13.740	12.9	13.7
50%	4	16.575	.9878	.4939	15.003	18.147	15.1	17.2
75%	4	19.425	1.1500	.5750	17.595	21.255	17.7	20.0
100%	4	21.525	.6602	.3301	20.475	22.575	20.6	22.0
Total	28	14.807	6.3021	1.1910	12.363	17.251	6.0	22.0

Test of Homogeneity of Variances

Diameter Zona Hambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.430	6	21	.250

Lampiran 5
Uji One-way ANOVA

ANOVA

Diameter Zona Hambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1063.569	6	177.261	423.491	.000
Within Groups	8.790	21	.419		
Total	1072.359	27			

Lampiran 6

Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter Zona Ham bat

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K Neg	K Pos	-15.000*	.4575	.000	-16.487	-13.513
	12.5%	.000	.4575	1.000	-1.487	1.487
	25%	-7.125*	.4575	.000	-8.612	-5.638
	50%	-10.575*	.4575	.000	-12.062	-9.088
	75%	-13.425*	.4575	.000	-14.912	-11.938
	100%	-15.525*	.4575	.000	-17.012	-14.038
K Pos	K Neg	15.000*	.4575	.000	13.513	16.487
	12.5%	15.000*	.4575	.000	13.513	16.487
	25%	7.875*	.4575	.000	6.388	9.362
	50%	4.425*	.4575	.000	2.938	5.912
	75%	1.575*	.4575	.033	.088	3.062
	100%	-.525	.4575	.906	-2.012	.962
12.5%	K Neg	.000	.4575	1.000	-1.487	1.487
	K Pos	-15.000*	.4575	.000	-16.487	-13.513
	25%	-7.125*	.4575	.000	-8.612	-5.638
	50%	-10.575*	.4575	.000	-12.062	-9.088
	75%	-13.425*	.4575	.000	-14.912	-11.938
	100%	-15.525*	.4575	.000	-17.012	-14.038
25%	K Neg	7.125*	.4575	.000	5.638	8.612
	K Pos	-7.875*	.4575	.000	-9.362	-6.388
	12.5%	7.125*	.4575	.000	5.638	8.612
	50%	-3.450*	.4575	.000	-4.937	-1.963
	75%	-6.300*	.4575	.000	-7.787	-4.813
	100%	-8.400*	.4575	.000	-9.887	-6.913
50%	K Neg	10.575*	.4575	.000	9.088	12.062
	K Pos	-4.425*	.4575	.000	-5.912	-2.938
	12.5%	10.575*	.4575	.000	9.088	12.062
	25%	3.450*	.4575	.000	1.963	4.937
	75%	-2.850*	.4575	.000	-4.337	-1.363
	100%	-4.950*	.4575	.000	-6.437	-3.463
75%	K Neg	13.425*	.4575	.000	11.938	14.912
	K Pos	-1.575*	.4575	.033	-3.062	-.088
	12.5%	13.425*	.4575	.000	11.938	14.912
	25%	6.300*	.4575	.000	4.813	7.787
	50%	2.850*	.4575	.000	1.363	4.337
	100%	-2.100*	.4575	.003	-3.587	-.613
100%	K Neg	15.525*	.4575	.000	14.038	17.012
	K Pos	.525	.4575	.906	-.962	2.012
	12.5%	15.525*	.4575	.000	14.038	17.012
	25%	8.400*	.4575	.000	6.913	9.887
	50%	4.950*	.4575	.000	3.463	6.437
	75%	2.100*	.4575	.003	.613	3.587

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 7

Uji Korelasi-Regresi

Correlations

		Konsentrasi	Diameter Zona Hambat
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	.952*
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	24	24
Diameter Zona Hambat	Pearson Correlation	.952**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	24	24

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.952 ^a	.906	.902	1.9549

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi