EFEK ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL BUAH BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi L.*) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

oleh:

CHINTYA AYU PUTRI NASTITI
145070107111078

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL BUAH BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi L.*) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

Oleh:

Chintya Ayu Putri Nastiti

145070107111078

Telah diuji pada

Hari: Kamis

Tanggal: 22 November 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wajib, M.Kes, Sp.Rad(K)
NIP 196810311996012001

Pembimbing-I/ Penguji-II,

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

Pembimbing-II/ Penguji-III

dr. Sinta Murlistyarini, Sp.KK
NIP 198112102012122001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,

dr. Tri Wahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP 196310221996012001

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul "Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara *in vitro*".

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Bapak Eko Budhi Prasetyo, S.H., M.H., Mama Ratna Wahyuniati, S.H., M.Hum, serta kakak-kakakku dr. Prasetyo Bhagus Putra Pradana, S.Ked, dan drg. Merina Diah Eri Nurmasari atas cinta, doa, serta dukungan yang tak terhingga.
2. Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K) sebagai pembimbing pertama yang telah meluangkan waktu untuk selalu memberikan bimbingan, ilmu, semangat, dan memberi masukan selama pengerjaan Tugas Akhir ini.
3. dr. Sinta Murlistyarini, Sp.KK sebagai pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu untuk selalu memberikan bimbingan, ilmu, semangat, dan memberi masukan selama pengerjaan Tugas Akhir ini.
4. Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wajib, M.Kes, Sp.Rad(K) sebagai Ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir yang telah memberikan masukan untuk menyempurnakan Tugas Akhir.
5. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

6. dr. Tri Wahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K), sebagai Ketua Program Studi Kedokteran yang telah memberikan penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. Segenap Anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi, sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.
8. Para analis dan staf Laboratorium Mikrobiologi Klinik FKUB dan Laboratorium Farmakologi FKUB, terutama Pak Slamet dan Bu Ferrida yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.
9. Teman-teman seperjuangan Program Studi Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan dukungan dan semangat.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa karya ilmiah ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 27 Oktober 2018

Penulis

ABSTRAK

Nastiti, Chintya Ayu Putri. 2018. ***Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus Secara in vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani, A.S., Sp.MK(K) dan (II) dr. Sinta Murlistyarini, Sp.KK.

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab utama penyakit di daerah tropis seperti di Indonesia. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) adalah flora normal pada manusia. *S aureus* dapat meningkatkan risiko infeksi saat pertahanan hospes terganggu. Bakteri ini dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya menginvasi jaringan dan memproduksi toksin. Berdasarkan hal tersebut, peneliti mencari pengobatan alternatif dari bahan alam yang memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*. Buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) adalah tanaman pekarangan yang mudah didapatkan. Di samping itu, buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) diketahui mengandung berbagai senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri, yaitu flavonoid, alkaloid, dan tanin. Terkait dengan hal itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang dilakukan dengan uji eksperimental menggunakan metode dilusi tabung. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%. Pada setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Uji normalitas dan uji komparasi menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Hubungan sangat kuat dengan hasil uji korelasi ($r= 0.960$). Dari penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *S. aureus* dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sebesar 0,2% dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 0,6%.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, *S. aureus,* buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*), antibakteri

.

ABSTRACT

Nastiti, Chintya Ayu Putri. 2018. **Antibacterial Effect of Bilimbi Fruit Extract (*Averrhoa bilimbi L.*) on *Staphylococcus aureus in vitro***. Final assignment Medical Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani, A.S., Sp.MK(K) and (II) dr. Sinta Murlistyarini, Sp.KK.

Infection is one of the main causes of disease in tropics such as Indonesia. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a normal flora in humans. *S. aureus* can increase infection risk when the host attacks. These bacteria can process the ability through its ability to invade tissue and make toxins. By this, researchers are looking for alternative material to natural ingredients that have the potential as antibacterials against *S. aureus*. Bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi L.*) is a garden plant that is easily obtained. In addition, the bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi L.*) has various types of active compounds as antibacterials, called flavonoids, alkaloids, and tannins. Related to this, this study aims to determine the ethanol extract of bilimbi fruit on the growth of *S. aureus* which was carried out by experimental test using tube dilution method. The concentration which is the current study is 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%. Each concentrations group repeated 4 times. Normality test and comparative test showed that there were significant differences ($p < 0.05$). The relationship is very strong with the test results ($r = 0.960$). From this research, it was found that ethanol extract of bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi L.*) could inhibit the growth of colony of *S. aureus* with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 0.2% and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of 0.6%.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *S. aureus,* bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi L.*), antibacterial

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Chintya Ayu Putri Nastiti

NIM : 145070107111078

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, ...

Yang membuat pernyataan

Materai dan tanda tangan

(Chintya Ayu Putri Nastiti)

NIM. 145070107111078

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN ii
KATA PENGANTAR iii
ABSTRAK (INDONESIA) v
ABSTRAK (INGGRIS) vi
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN vii
DAFTAR ISI viii
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR TABEL xii
DAFTAR SINGKATAN xiii
DAFTAR LAMPIRAN xiv
BAB 1 PENDAHULUAN 15
1.1 Latar Belakang 15
1.2 Rumusan Masalah 18
1.3 Tujuan Penelitian 18
1.3.1 Tujuan Umum 18
1.3.2 Tujuan Khusus 18
1.4 Manfaat Penelitian 18
1.4.1 Manfaat Akademis 18
1.4.2 Manfaat Praktis 19
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA 20
2.1 *Staphylococcus aureus* 20
2.1.1 Taksonomi 20
2.1.2 Morfologi 21
2.1.3 Struktur Antigen 21
2.1.4 Enzim dan Toksin 21
2.1.5 Patogenesis Infeksi 23
2.1.6 Kepentingan Klinis 23
2.1.7 Terapi 24
2.1.8 Sifat Kultur dan Karakteristik Pertumbuhan 25
2.1.9 Identifikasi Biakan 26
2.1.10 Uji Laboratorium 26
2.1.11 Uji Kepekaan Bakteri 27
2.2 Belimbing Wuluh 29

2.2.1 Taksonomi 29
2.2.2 Morfologi Tanaman 30
2.2.3 Fitokimia 31
2.2.4 Kandungan Buah Belimbing Wuluh 32
2.2.4.1 Flavonoid 32
2.2.4.2 Alkaloid 32
2.2.4.3 Tanin 33
2.2.4.4 Polifenol 33
2.2.4.5 Steroid 33
2.2.5 Sifat Kelarutan Bahan Aktif dalam Buah Belimbing Wuluh 34
2.2.6 Mekanisme Kerja Antibakteri 34
2.2.7 Manfaat Dalam Bidang Kesehatan 35
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN 36
3.1 Kerangka Konsep 36
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep 36
3.3 Hipotesis Penelitian 37
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN 38
4.1 Rancangan Penelitian 38
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian 38
4.3 Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan 38
4.4 Variabel Penelitian 39
4.4.1 Variabel Bebas 40
4.4.2 Variabel Tergantung 40
4.5 Definisi Operasional 40
4.6 Instrumen Penelitian 41
4.6.1 Identifikasi Bakteri 41
4.6.2 Ekstrak Buah Belimbing Wuluh 42
4.7 Prosedur Penelitian 42
4.7.1 Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* 42
4.7.1.1 Pewarnaan Gram 42
4.7.1.2 Tes Katalase 43
4.7.1.3 Tes Koagulase 43
4.7.1.4 Suspensi Uji Bakteri 44
4.7.2 Pembuatan Ekstrak Belimbing Wuluh 45
4.7.3 Uji Efek Antibakteri 46
4.8 Alur Kerja Penelitian 47
4.9 Pengolahan Data 48

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....49
5.1 Hasil Penelitian.....49
5.1.1 Hasil Ekstraksi Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*).....49
5.1.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*.....49
5.1.3 Menentukan Kadar Hambat Minimum.....51
5.1.4 Hasil Pengukuran Kadar Bunuh Minimum.....53
5.2 Analisis Data.....55
5.2.1 Uji Normalitas Data.....55
5.2.2 Uji Kruskal-Wallis.....56
5.2.3 Uji Mann-Whitney.....56
5.2.4 Uji Korelasi Spearmann.....58
BAB 6 PEMBAHASAN.....59
BAB 7 PENUTUP.....64
7.1 Kesimpulan.....64
7.2 Saran.....64
DAFTAR PUSTAKA.....66
LAMPIRAN.....71

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mikroskopik *Staphylococus aureus*..... 20

Gambar 2.2 Buah Belimbing Wuluh..... 30

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian..... 36

Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba..... 47

Gambar 5.1 Pengecatan Gram..... 50

Gambar 5.2 Hasil Tes Katalase Positif..... 50

Gambar 5.3 Hasil Tes Koagulase Positif..... 51

Gambar 5.4 Kontrol Positif dan Kontrol Negatif..... 52

Gambar 5.5 Hasil Dilusi Tabung Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; dan 0,6%... 52

Gambar 5.6 Pertumbuhan Koloni Bakteri *Staphylococcus Aureus* Di Media Agar NAP dengan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh Bakteri Pada Medium Agar..... 54

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Belimbing Wuluh..... 31

Tabel 5.1 Jumlah Koloni Bakteri Terhadap Berbagai Konsentrasi Ekstrak.. 55

Tabel 5.2 Hasil Analisis Kruskal-Wallis…….. 56

Tabel 5.3 Hasil Ringkasan Analisis Mann-Whitney…….. 58

DAFTAR SINGKATAN

BAP	:	*Blood Agar Plate*
CFU	:	*Colony Forming Unit*
HA-MRSA	:	*Healthcare Associated MRSA*
ICU	:	*Intensive Care Unit*
KBM	:	Kadar Bunuh Minimum
KHM	:	Kadar Hambat Minimum
KN	:	Kontrol Negatif
KP	:	Kontrol Positif
ml	:	Mililiter
MRSA	:	*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*
MSA	:	*Mannitol Salt Agar*
MSCRAMMs	:	*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*
NAP	:	*Nutrient Agar Plate*
OD	:	*Optical Density*
SPSS	:	*Statistical Product of Service Solution*
TSST-1	:	*Toxic Shock Syndrome*

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Determinasi Buah Belimbing Wuluh.....	71
Lampiran 2	Hasil Penelitian Pendahuluan I.....	72
	Hasil Penelitian Pendahuluan II.....	73
	Hasil Penelitian Pendahuluan III.....	74
	Hasil Penelitian Pendahuluan IV.....	75
Lampiran 3	Hasil Uji Mann-Whitney.....	76
Lampiran 4	Hasil Uji Korelasi Spearmann.....	87

Brawijaya Universitas Brawijaya

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL BUAH BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi L.*) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

Oleh:

Chintya Ayu Putri Nastiti

145070107111078

Telah diuji pada

Hari: Kamis

Tanggal: 22 November 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wajib, M.Kes, Sp.Rad(K)
NIP 196810311996012001

Pembimbing-I/ Penguji-II,

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

Pembimbing-II/ Penguji-III

dr. Sinta Murlistyarini, Sp.KK
NIP 198112102012122001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,

dr. Tri Wahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP 196310221996012001

ABSTRAK

Nastiti, Chintya Ayu Putri. 2018. ***Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus Secara in vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K) dan (2) dr. Sinta Murlistyarini, Sp.KK.

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab utama penyakit di daerah tropis seperti di Indonesia. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) adalah flora normal pada manusia. *S aureus* dapat meningkatkan risiko infeksi saat pertahanan hospes terganggu. Bakteri ini dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya menginvasi jaringan dan memproduksi toksin. Berdasarkan hal tersebut, peneliti mencari pengobatan alternatif dari bahan alam yang memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*. Buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) adalah tanaman pekarangan yang mudah didapatkan. Di samping itu, buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) diketahui mengandung berbagai senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri, yaitu flavonoid, alkaloid, dan tanin. Terkait dengan hal itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang dilakukan dengan uji eksperimental menggunakan metode dilusi tabung. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%. Pada setiap kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Uji normalitas dan uji komparasi menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Hubungan sangat kuat dengan hasil uji korelasi ($r= 0.960$). Dari penelitian ini didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *S. aureus* dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sebesar 0,2% dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 0,6%.

Kata kunci: *Staphylococcus aureus*, *S. aureus,* buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*), antibakteri

.

ABSTRACT

Nastiti, Chintya Ayu Putri. 2018. **Antibacterial Effect of Bilimbi Fruit Extract (*Averrhoa bilimbi L.*) on *Staphylococcus aureus in vitro***. Final assignment Medical Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Supervisors: (1) (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K) and (2) dr. Sinta Murlistyarini, Sp.KK.

Infection is one of the main causes of disease in tropics such as Indonesia. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a normal flora in humans. *S. aureus* can increase infection risk when the host attacks. These bacteria can process the ability through its ability to invade tissue and make toxins. By this, researchers are looking for alternative material to natural ingredients that have the potential as antibacterials against *S. aureus*. Bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi L.*) is a garden plant that is easily obtained. In addition, the bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi L.*) has various types of active compounds as antibacterials, called flavonoids, alkaloids, and tannins. Related to this, this study aims to determine the ethanol extract of bilimbi fruit on the growth of *S. aureus* which was carried out by experimental test using tube dilution method. The concentration which is the current study is 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%. Each concentrations group repeated 4 times. Normality test and comparative test showed that there were significant differences ($p < 0.05$). The relationship is very strong with the test results ($r = 0.960$). From this research, it was found that ethanol extract of bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi L.*) could inhibit the growth of colony of *S. aureus* with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 0.2% and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of 0.6%.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *S. aureus,* bilimbi fruit (*Averrhoa bilimbi L.*), antibacterial

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu permasalahan kesehatan di masyarakat yang tidak pernah dapat diatasi secara tuntas yang menjadi penyebab utama penyakit di daerah tropis seperti di Indonesia (Jawetz, 2005).

Staphylococcus aureus adalah flora normal kulit, yang banyak terlokalisasi di membran mukosa hidung pada individu yang sehat. Koloni *Staphylococcus aureus* secara signifikan meningkatkan risiko infeksi saat pertahanan *host* terganggu (Plata et al., 2009). *Staphylococcus aureus* dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya untuk menginvasi jaringan dan memproduksi toksin (Adelberg, 1997). Hampir setiap orang pernah mengalami berbagai infeksi *Staphylococcus aureus* selama hidupnya, dari tingkat infeksi yang ringan hingga infeksi yang mengancam jiwa (Brook, 2010). Manifestasi klinis dari bakteri *Staphylococcus aureus* sangat beragam mulai dari bentuk klinis yang jarang menimbulkan kematian seperti furunkel, karbunkel, impetigo, osteomyelitis, keracunan makanan, tonsilitis, bronchitis, pneumonitis, hingga bentuk klinis berat dan menyebabkan kematian seperti septisemia, ensefalitis, dan *toxic shock syndrom*e (Dzen et al., 2010).

Dalam empat dekade terakhir, insiden infeksi *Staphylococcus aureus* yang didapat di rumah sakit / *Healthcare Associated Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) telah meningkat terutama pada pasien

yang mengalami luka terbuka dan pasien yang menggunakan kateter (Soedarto, 2015). Prevalensi MRSA di beberapa negara Asia, seperti Taiwan dan Cina, termasuk yang tertinggi di dunia (Severin, 2008).

Secara global, pasien di unit perawatan intensif/ *Intensive Care Unit* (ICU) mengalami peningkatan munculnya patogen dan penyebaran patogen resisten antibiotik yang dikaitkan dengan keparahan penyakit pasien, panjang paparan perangkat, prosedur invasif, peningkatan kontak pasien dengan tenaga kesehatan, dan lama rawat di ICU. Resistensi antibiotik adalah masalah besar di dunia pada ICU, termasuk di Indonesia. Pada bakteri yang diisolasi dari 722 pasien di ICU Rumah Sakit Fatmawati, Jakarta, Indonesia, tingkat infeksi nosokomial dalam 1 tahun adalah 385 dari pasien yang menerima perawatan antibiotik. Penggunaan antibiotik berkontribusi terhadap munculnya resistensi antibiotik pada bakteri gram positif serta gram negatif. Di negara berkembang, antibiotik diresepkan untuk 44%-97% pasien di rumah sakit, sering kali tidak tepat. Di Indonesia, proporsi tinggi dari pasien di rumah sakit menerima antibiotik tetapi 32% dari resep adalah indikasi yang tidak sesuai. Hal ini berkaitan dengan penggunaan luas sefalosporin generasi ketiga dan antibiotik kuinolon. Resep antibiotik di ICU biasanya bersifat empiris. Oleh karena itu, penggunaan antibiotik yang tepat sangat penting tidak hanya dalam memastikan hasil yang optimal, tetapi juga dalam mencegah munculnya bakteri resistensi multi obat (Radji, 2011).

Terapi antibiotik baru seperti vancomicin lebih mahal walaupun aktivitas antibakterinya baik. Hal tersebut mendasari untuk menemukan

antibakteri dengan efektivitas yang sama namun dengan toksisitas yang rendah, biaya yang lebih terjangkau dan ketersediaannya di alam dapat diperbaharui secara terus menerus. Salah satu bahan yang dapat digunakan yaitu bahan-bahan alam. Indonesia memiliki beragam tanaman herbal yang dapat dimanfaatkan dalam terapi berbagai penyakit, tetapi tetap membutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai mekanismenya. Salah satu diantara tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah belimbing wuluh.

Belimbing wuluh merupakan salah satu tanaman asli Indonesia dan daratan Malaya yang banyak ditemui sebagai tanaman pekarangan yang mudah ditanam dan tidak memerlukan perawatan khusus sehingga kemampuannya dalam menghasilkan buah sepanjang tahun terbuang sia-sia (Tohir, 1981).

Buah belimbing wuluh mengandung berbagai senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri seperti flavonoid, fenol, alkaloid, tanin, dan steroid (Litbangkes, 2001).

Berdasarkan uraian diatas, maka ingin dilakukan penelitian mengenai efektivitas ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* karena masih sedikit penelitian mengenai hal tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

a. Mengetahui dosis konsentrasi ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

b. Mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Efek antibakteri ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dapat digunakan untuk menambah wawasan keilmuan sebagai dasar penelitian lebih lanjut.

1.4.2 Manfaat Praktis

a. Memperoleh pengobatan alternatif yang murah bahan bakunya, aman, dan sangat bermanfaat bagi masyarakat luas terutama pada pengobatan terapi infeksi *Staphylococcus aureus*.

b. Menambah koleksi bahan antibakteri yang berasal dari bahan alami.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Taksonomi

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Domain : Bacteria

Kingdom : Eubakteria

Phylum : Firmicutes

Class : Bacilli

Ordo : Bacillales

Famili : Staphylococcaceae

Genus : Staphylococococcus

Species : *Staphylococcus aureus* (Soedarto, 2015).

Gambar 2.1 Morfologi *Staphylococcus aureus* diamati dengan mikroskop pembesaran 1000x, pengecatan gram (Chamberlain, 2017).

2.1.2 Morfologi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif, berukuran sekitar 1 µm, tersusun dalam kelompok-kelompok, tidak bergerak, dan tidak membentuk spora (Adelberg, 1997). Koloni di media padat berbentuk bulat, halus mengkilat, meninggi, dan bewarna abu-abu hingga kuning keemasan (Carrol dkk, 2016).

2.1.3 Struktur Antigen

Komponen antigen utama *Staphylococcus aureus* adalah peptidoglikan, asam teikoat, dan protein A pada dinding sel (Carrol dkk, 2016). Peptidoglikan adalah substansi polisakarida yang membentuk dinding sel *Staphylococcus aureus.* Asam teikoat mengandung *glycerophosphate.* Bersama dengan peptidoglikan, asam teikoat ini membentuk matriks yang menyediakan fungsi elastisitas (Brook, *et al. 2013*). Protein A adalah adhesin yang termasuk dalam MSCRAMMs (*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*). MMSCRAMs adalah faktor virulensi penting yang membantu perlekatan bakteri ke sel tubuh (Carrol dkk, 2016).

2.1.4 Enzim dan Toksin

Staphylococcus aureus dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuan berkembang biak dan menyebar ke dalam jaringan melalui pembentukan zat ekstraselular. Beberapa dari bahan tersebut

adalah enzim, sedangkan yang lain diduga toksin (Adelberg, 1997). Enzim yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* yaitu koagulase, hialuronidase dan stafilokinase. Koagulase merupakan suatu protein yang menyerupai enzim dan dapat menggumpalkan plasma oksalat dengan bantuan serum faktor. Serum faktor akan bereaksi dengan koagulase dan menghasilkan aktivitas pembekuan. Enzim ini lalu mengubah protrombin menjadi trombin. Enzim koagulase bereaksi terhadap pembentukan fibrin, kemudian fibrin disimpan pada permukaan *Staphylococcus aureus* untuk melindungi bakteri dari kerusakan sel akibat proses fagositik (Adelberg, 1997). Hialuronidase dihasilkan oleh tes koagulase positif dan stafilokinase merupakan fibrinolisis fibrin yang selektif dan sangat kuat (Dzen *et al., 2010*). Pembentukan zat ekstraselular lainnya adalah enterotoksin, toksin eksfoliatif/epidermolitik, dan *toxic shock syndrome* (TSST-1). Enterotoksin adalah salah satu penyebab keracunan makanan, sifat enterotoksin yakni tahan terhadap panas dan enzim saluran pencernaan. Toksin eksfoliatif/epidermolitik dapat menghancurkan matriks mukopolisakarida epidermis kulit dan dapat menyebabkan *staphylococcal scalded skin syndrome* yang umumnya terjadi pada bayi dan anak kecil (Soedarto, 2015). Sedangkan TSST-1 menstimulasi sel T dan merangsang sel-sel imunokompeten dalam jumlah yang cukup banyak, sehingga digolongkan menjadi

superantigen. Toksin ini menyebabkan manifestasi klinis berupa febris, ruam kulit, dan bahkan menimbulkan syok (Dzen *et al., 2010*).

2.1.5 Patogenesis Infeksi

Staphylococcus aureus menyebabkan penyakit pada manusia melalui invasi jaringan dan atau karena pengaruh toksin yang dihasilkannya. Infeksi dimulai dari tempat koloni patogen pada tubuh, lalu ditularkan melalui tangan ke tempat bakteri masuk ke tubuh, misalnya di kulit yang terluka, tempat insisi pembedahan, tempat masuk kateter vaskuler, atau tempat lain yang lemah pertahanannya (Soedarto, 2015).

2.1.6 Kepentingan Klinis

Staphylococcus aureus menyebabkan berbagai infeksi yang dibedakan menjadi dua kelompok yaitu *inflammatory* dan *toxin mediated.* Gejala klinis *inflammatory* beberapa diantara yaitu infeksi kulit primer seperti impetigo yang ditularkan dari orang ke orang; infeksi kulit sekunder yaitu terkait dengan eksim, luka bedah, perangkat infus, luka bakar, dan septikemia (sepsis) yang didapatkan dari berbagai lesi lokal terutama infeksi pada luka; abses yang menyebar melalui aliran limfatik dan aliran darah ke bagian lain dalam tubuh; infeksi pneumonia pada pasien *post operasi* atau menderita infeksi saluran pernafasan seperti influenza; dan endokarditis yang bersifat cepat dan merusak,

hal ini berkaitan dengan penyalahgunaan obat intravena (Gillespie *et al.,* 2012). Sedangkan untuk gejala klinis berdasarkan *toxin mediated* diantaranya yaitu; keracunan makanan yang terjadi akibat menelan makanan yang terkontaminasi oleh enterotoksin *Staphylococcus aureus*. Masa inkubasi singkat (2-6 jam), gejala yang timbul biasanya muntah dan diare tetapi sembuh spontan dalam 24-36 jam (Dzen *et al.*, 2010); *Staphylococcal scalded skin syndrome* atau penyakit ritter yang terjadi apabila lapisan epidermis bereaksi terhadap pengeluaran eksofoliatin oleh bakteri, mula-mula terjadi eritema selulitis, lalu melepuhnya kulit di tempat infeksi, kemudian terjadi demam dan diikuti terjadinya impetigo. Selain itu juga dapat terjadi folikulitis, yaitu pembentukan pustul lunak dan infeksi folikel rambut (Soedarto, 2015); dan *toxic shock syndrome* yang merupakan superantigen yang dapat menyebabkan penderita mengalami eritema makular, demam mendadak, muntah, diare, mialgia, *scarlitiniform rash,* dan gagal jantung serta gagal ginjal pada kasus yang sangat berat (Soedarto, 2015).

2.1.7 Terapi

Infeksi multiple seperti jerawat, furunkel, dan karbunkel dapat diberi tetracycline sebagai terapi jangka lama. Abses dan lesi supuratif tertutup dapat diterapi dengan drainase dan antibiotik. Infeksi sistemik

seperti bakterimia, endokarditis, dan pneumonia menggunakan terapi vankomisin intravena. (Brooks, 2001).

2.1.8 Sifat Kultur dan Karakteristik Pertumbuhan

Staphylococcus aureus tumbuh dengan baik pada suasana aerobik dan tumbuh dengan cepat pada suhu 37ºC selama 18-24 jam tetapi pembentukkan pigmen yang terbaik ada pada suhu kamar (20ºC-35ºC) (Plata *et al*., 2009). *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP), *Blood Agar Plate* (BAP), dan *Mannitol Salt Agar* (MSA) (Brooks, 2001).

a. *Staphylococcus aureus* dapat dibiakkan pada media *Nutrient Agar Plate* (NAP) dengan suasana aerob pada suhu 37ºC selama 24 jam lalu akan didapatkan bentuk koloni dengan diameter 2-3mm, dengan permukaan yang halus, berbentuk bulat, menonjol, dan permukaan berkilau. Medium NAP digunakan untuk mengetahui adanya pembentukan pigmen bewarna emas (Kayser et al., 2005).
b. Pada *Blood Agar Plate* (BAP) koloni bakteri akan tampak lebih besar dan memberikan zona hemolisis yang jernih di sekitar koloni yang mirip dengan *Streptococcus β-hemolyticus*.
c. *Mannitol Salt Agar* merupakan medium yang selektif yang digunakan untuk isolasi *Staphylococcus* patogen. Medium ini mengandung mannitol, indikator merah fenol, dan NaCl 7,5%. Pada medium *Mannitol Salt Agar* ini, *Staphylococcus aureus*

memproduksi koloni kecil yang dikelilingi zona kuning, hal ini dikarenakan *Staphylococcus aureus* memfermentasikan mannitol lalu menghasilkan asam yang mengubah warna indikator merah menjadi kuning (Brooks, 2001).

2.1.9 Identifikasi Biakan

Pewarnaan gram, tes katalase, dan tes koagulase merupakan bagian penting dalam mengidentifikasi bakteri. Pewarnaan gram digunakan untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. Pada pewarnaan ini dapat diidentifikasi bahwa *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif. Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Pada *Staphylococcus* akan menunjukkan hasil positif sedangkan pada *Streptococcus* akan menunjukkan hasil negatif (Brooks, 2001). Tes koagulase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus* jenis lainnya (Brown *et al.,* 2005).

2.1.10 Uji Laboratorium

Spesimen dapat diambil dari pus, aspirat trakea, darah, sputum, atau cairan spinal. Hapusan spesimen diperiksa dengan pewarnaan gram, yang bertujuan untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. *Staphylococcus aureus* termasuk dalam bakteri gram positif dan memunculkan penampakan bakteri *coccus* bergerombol bewarna

ungu sedangkan bakteri gram negatif bewarna merah. Namun, dalam pewarnaan gram tidak dapat membedakan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan jenis *Staphylococcus* yang lain. Maka dari itu, untuk membedakannya dilakukan tes koagulase. *Staphylococcus aureus* akan menunjukan hasil tes koagulase positif (adanya gelembung sebagai tanda dihasilkannya O_2). Sedangkan tes katalase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* (Adelberg, 1997).

2.1.11 Uji Kepekaan Bakteri

Uji kepekaan bakteri dilakukan untuk mengetahui kepekaan suatu antibakteri terhadap bakteri tertentu. Penilaian uji kepekaan bakteri dapat menggunakan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). KHM mengukur konsentrasi antibakteri terkecil yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan inokulum standar dalam kondisi tertentu (efek bakteriostatik), sedangkan KBM mengukur efek bakterisidal yang bisa dilihat dari tabung kultur yang tetap jernih (bakteri tidak tumbuh). Jika tabung tersebut dikultur ulang pada media padat yang tidak berisi antibiotik maka dapat diukur nilai KBM. KBM ditandai dengan pengurangan koloni hingga 99,9% dibawah kontrol (Carrol, 2016). Uji kepekaan dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram dan metode dilusi (Dzen, *et al.,* 2010).

a. Metode Difusi cakram

Metode ini dilakukan untuk mengetahui kepekaan isolat bakteri terhadap suatu antibakteri (peka, sedang, dan resisten). Uji ini dilakukan dengan cara meletakkan cakram kertas yang sudah dijenuhkan dengan zat antibakteri ke dalam media padat yang dicampur bakteri uji, kemudian diinkubasikan pada suhu 37ºC selama 18-24 jam. Lalu diamati ada atau tidak zona jernih disekitar cakram kertas, yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri (Dzen *et al.,* 2010).

b. Metode Dilusi

Metode ini digunakan untuk mengukur KHM dan KBM. Media yang digunakan yaitu media kaldu (dilusi tabung) dan media agar (dilusi agar). Metode dilusi tabung menggunakan pertumbuhan cair yang mengandung konsentrasi meningkat (seri pengenceran dua kali lipat) dari antibakteri yang diinokulasikan dengan bakteri uji serta menggunakan satu tabung berisi bakteri dalam medium kaldu tanpa diberi zat antibakteri yang digunakan sebagai kultur kontrol. Setelah tabung diinkubasikan pada suhu 37ºC selama 18-24 jam, maka dapat diamati kekeruhan yang terjadi pada tabung. Konsentrasi terendah antibakteri pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih dibaca sebagai KHM (Hilpert, 2008). Lalu untuk menghitung KBM, semua kultur dari tabung jernih diinkubasikan

lagi pada suhu 37ºC selama 18-24 jam. Simpan tabung kultur kontrol dalam lemari es dengan suhu ±4ºC sebagai standar kontrol inhibisi. Setelah 18-24 jam, dapat diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri. Konsentrasi terendah antibakteri dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri dibaca sebagai KBM (Hilpert, 2008). Pada metode dilusi agar, konsentrasi antibakteri dan bakteri yang akan diuji dimasukkan bersama sama kedalam media padat. Masing-masing konsentrasi zat antibakteri diuji dengan menggunakan satu media agar. setelah itu diinokulasikan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37º selama 24 jam. Setelah diinkubasi, lalu dapat diamati koloninya. KHM didapat dari konsentrasi zat antibakteri terendah yang dapat menghambat pertumbuhan koloni pada medium agar (Hilpert, 2008).

2.2 Belimbing Wuluh

2.2.1 Taksonomi

Belimbing wuluh dalam (*Averrhoa bilimbi L.*) kedudukannya dalam ilmu taksonomi tumbuhan adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Sub Kingdom : Tracheobionta

Super Divisi : Spermatophyta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Geraniales

Famili : Oxalidaceae

Genus : Averrhoa

Spesies : *Averrhoa bilimbi L*. (Dasuki,1991)

Gambar 2.2 **Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.)* berbentuk elips dengan panjang 4-10cm, bewarna hijau, dengan kelopak bunga yang menempel di ujung buah (Plantamor, 2016).**

2.2.2 Morfologi Tanaman

Belimbing wuluh dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian 4-8 meter. Batang berbentuk tegak, permukaan kasar, dan banyak tonjolan. Daun belimbing wuluh majemuk, berbentuk oval, menyirip ganjil dengan 21 sampai 45 pasang anak daun ya ng berselang-seling. Bunga berukuran kecil, berkelompok, bewarna ungu kemerahan, ditemukan di batang dan cabang. Buah belimbing wuluh berbentuk

elips seperti mentimun dengan panjang 4-10cm. Buah muda bewarna hijau dengan sisa kelopak bunga menempel di ujungnya. Sedangkan buah yang masak bewarna kuning pucat, daging buah berair, dan sangat asam (Ariharan *et al.*, 2012).

2.2.3 Fitokimia

Berdasarkan hasil pemeriksaan kandungan kimia belimbing wuluh yang dilakukan Suliani menunjukkan bahwa buah belimbing wuluh mengandung senyawa aktif yaitu alkaloid, flavonoid, dan fenol. Sedangkan kandungan senyawa aktif pada daun belimbing wuluh adalah alkaloid, steroid, dan tanin (Suliani, 2016). Adapun fitokimia tanaman belimbing wuluh disajikan dalam tabel 2.1.

Tabel 2.1 Identifikasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak buah dan daun belimbing wuluh (Nair, 2016).

Metabolit Sekunder	Buah	Daun
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	-
Fenol	+	+
Tanin	+	+
Saponin	-	-
Terpenoid	-	-
Steroid	+	+

Keterangan :
+ : Senyawa terdapat pada ekstrak
- **:** Senyawa tidak ada pada ekstrak

2.2.4 Kandungan Buah Belimbing Wuluh

Buah belimbing wuluh mengandung banyak vitamin C alami yang berguna sebagai penambah daya tubuh dan perlindungan terhadap berbagai penyakit. Pada kandungan fitokimia dan aktivitas farmakologi, buah belimbing wuluh bisa digunakan untuk mengatasi beberapa penyakit karena efektivitasnya sebagai antibakteri, antiinflamasi, dan antioksidan (Kumar, 2013). Kandungan kimia buah belimbing wuluh mengandung flavonoid, tanin, dan alkaloid. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dimiliki oleh banyak tanaman (Roy, 2011).

2.2.4.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dimiliki oleh banyak tanaman yang digunakan untuk melindunginya dari infeksi bakteri. Mekanisme antibakteri yang dimiliki oleh flavonoid adalah membentuk kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen, kovalen, dan efek hidrofobik. Kompleks ini dapat menginaktivasi adhesin, enzim, dan protein transport pada mikroba. Pada membran bakteri, flavonoid mampu mengurangi fluiditas sehingga menganggu fungsi membran (Kumar, 2013).

2.2.4.2 Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa organik yang berfungsi sebagai detoksifikasi. Mekanisme antibakteri dihubungkan dengan kemampuan

alkaloid untuk mengikat DNA sel sehingga fungsi sel bakteri terganggu (Lisdawati, 2002).

2.2.4.3 Tanin

Tanin merupakan *growth inhibitor,* sehingga banyak mikroorganisme yang dapat dihambat pertumbuhannya oleh tanin. Tanin mempunyai target polipeptida dinding sel. Mekanismenya yaitu menghambat enzim antibakteri dan menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara bereaksi dengan membran sel dan menginaktivasi materi genetik (Sari, 2017).

2.2.4.4 Polifenol

Polifenol yang terdiri atas tanin, flavonoid, dan asam fenolat merupakan komponen yang paling menonjol dalam kaitannya dengan aktivitas antibakteri. Mekanisme penghambatan antibakteri polifenol yaitu dapat mengerutkan dinding sel sehingga menganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel menjadi tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat dan bahkan mati. Lalu polifenol juga dapat bereaksi dengan membran sel. Komponen bioaktifnya dapat menyebabkan denaturasi protein serta menghambat ikatan ATP-ase pada membran sel (Kunaepah, 2008).

2.2.4.5 Steroid

Senyawa steroid bekerja dengan merusak struktural membran sel bakteri. Steroid dapat berikatan dengan protein dan lipid yang

terdapat pada membran sel dan dapat menimbulkan lisis pada sel (Suliani, 2016).

2.2.5 Sifat Kelarutan Bahan Aktif dalam Buah Belimbing Wuluh

Jenis pelarut dan konsentrasi merupakan faktor utama dalam proses ekstraksi. Alkohol seperti metanol dan etanol memiliki polaritas pelarut senyawa aktif yang memiliki pengaruh baik dan lebih efisien daripada air dalam mengekstraksi fenolik dalam tanaman. Namun karakteristik metanol lebih toksik ketika digunakan dalam aplikasi makanan dan farrmasi (Hassim, 2014). Etanol merupakan larutan yang bersifat semi polar, yang artinya dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar. Larutan etanol sangat bagus digunakan sebagai pelarut buah belimbing wuluh karena senyawa aktif yang terkandung didalamnya seperti flavonoid dan tanin yang bersifat polar dan alkaloid yang bersifat non polar (Rahmiati, 2017).

2.2.6 Mekanisme Kerja Antibakteri

Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antibakteri dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain:

a. Menganggu pembentukan membran atau dinding sel

Dinding sel bertindak sebagai barrier selektif yang melindungi sel dari lisis osmotik. Pada konsentrasi tertentu, molekul antibakteri berbentuk hidrofobik yang mana dapat

mengikat daerah hidrofobik membrane protein dan dapat melarut baik pada fase lipid dari membran bakteri. Agen yang merusak dinding sel inilah yang menyebabkan sel lisis.

b. Menganggu aktivitas material genetik

Sejumlah komponen antibakteri bekerja dengan merusak pembentukan asam nukleat (RNA dan DNA), hal ini menyebabkan terganggunya transfer informasi genetik sehingga menyebabkan proses pembelahan sel terganggu.

c. Menganggu kerja enzim

Senyawa antibakteri dapat menghambat kerja enzim jika mempunyai spesifitas yang sama antara ikatan komplek yang menyusun struktur enzim, sehingga aktivitas bakteri akan terganggu karena energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan menjadi berkurang (Brooks, 2001).

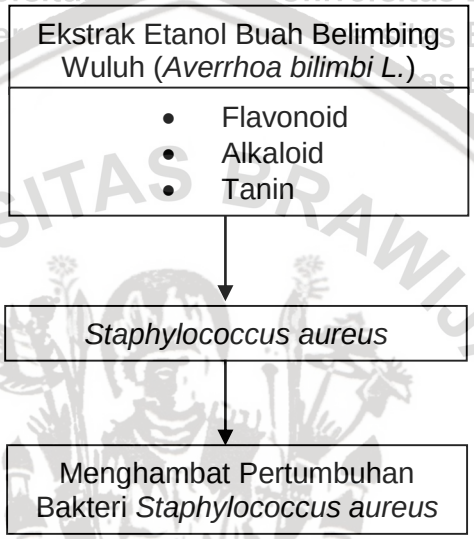
2.2.7 Manfaat Dalam Bidang Kesehatan

Secara tradisional tanaman ini banyak dimanfaatkan untuk mengatasi berbagai penyakit seperti batuk, sariawan, sakit gigi, gusi berdarah, dan jerawat. Selain itu, daun belimbing wuluh dapat dimanfaatkan sebagai obat sakit perut, mengurangi rasa sakit atau nyeri, dan antibakteri (Kumar, 2013).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

: Kandungan zat antibakteri ekstrak buah belimbing wuluh terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

: Efek terhadap

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Efek ekstrak hambat etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* diperankan oleh flavonoid, alkaloid, dan tanin.

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri berhubungan dengan kemampuan tanin dalam menginaktivasi adhesin sel bakteri (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada

permukaan sel. Tanin mempunyai target pada polipeptida dinding sel akan menyebabkan kerusakan pada dinding sel (Naim, 2004).

Mekanisme kerja alkaloid yaitu berikatan dengan DNA bakteri yang merupakan pusat pengaturan segala kegiatan sel. Ikatan tersebut akan menyebabkan aktivitas DNA terganggu sehingga terjadi kegagalan sintesis protein. Alkaloid juga dapat menghambat enzim topoisomerase II yang penting untuk replikasi DNA. Hal ini mengakibatkan timbulnya ketidakseimbangan genetik dalam DNA bakteri sehingga akan berujung pada kerusakan sel (Karou, 2005).

Mekanisme kerja flavonoid adalah dengan menganggu proses pembentukan dinding sel bakteri (Cowan, 1999). Hal ini menyebabkan gangguan integritas dinding sel yang berfungsi untuk melindungi sel dari lingkungan. Apabila lapisan dinding sel tidak terbentuk maka akan menyebabkan bakteri mudah lisis.

Ketiga kandungan diatas (flavonoid, alkaloid, dan tanin) mempunyai potensi terbesar sebagai penyebab efek antibakteri ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol buah belimbing wuluh memiliki potensi antibakteri untuk menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

BAB 4
METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian ini adalah *true experimental design* dengan menggunakan *tube dilution test* untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol buah belimbing wuluh yang dapat memengaruhi isolat bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Pengujian dilakukan dengan metode dilusi tabung yang meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* untuk menentukan KHM dan tahap *streaking* (penggoresan) pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) untuk menentukan KBM.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juli 2018.

4.3 Sampel dan Estimasi Jumlah Pengulangan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pada penelitian ini digunakan 7 macam konsentrasi perlakuan yang berbeda serta 1 kontrol negatif (ekstrak tanpa bakteri), sehingga jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus estimasi pengulangan (Loekito, 1998):

p (n-1) ≥ 15

Keterangan:
n = jumlah pengulangan
p = jumlah perlakuan

Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 7 macam konsentrasi (0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%) dari ekstrak buah belimbing wuluh yang didapatkan dari penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh peneliti, sehingga didapatkan jumlah pengulangan sampel sebagai berikut:

p (n-1) ≥ 15

7 (n-1) ≥ 15

7n-7 ≥ 15

7n ≥ 22

n ≥ 3,1 (dibulatkan menjadi 4)

Penelitian ini menggunakan 4 kali pengulangan uji bakteri.

Besar sampel dapat dihitung dengan rumus:

S = p x n

= 7 x 4

= 28

keterangan:
s = besar sampel
n = jumlah pengulangan
p = jumlah perlakuan

4.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel tergantung.

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol buah belimbing wuluh dengan berbagai konsentrasi, yaitu 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%. Penentuan konsentrasi ekstrak berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh peneliti.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus.*

4.5 Definisi Operasional

1) Buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari UPT Materia Medika kota Batu, Malang yang memiliki standar mutu simplisia yang baik.
2) Bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3) Ekstrak etanol buah belimbing wuluh didapatkan dengan menggunakan metode ekstraksi dengan pelarut etanol. Etanol dipilih karena etanol dapat menarik senyawa kimia aktif yang terdapat pada buah belimbing wuluh.
4) Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi ekstrak etanol buah belimbing wuluh terendah yang mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan kejernihan dalam tabung.

5) Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi ekstrak etanol buah belimbing wuluh terendah yang mampu membunuh *Staphylococcus aureus* yang dapat dilihat dari tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media agar.
6) Kontrol positif adalah biakan *Staphylococcus aureus* murni yang tidak dicampur dengan ekstrak buah belimbing wuluh yang dapat digunakan sebagai standar jumlah pertumbuhan bakteri tanpa ekstrak.
7) Kontrol negatif adalah ekstrak belimbing wuluh murni yang tidak dicampur dengan bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril dimana nilai kontrol positif adalah 0% (tidak terdapat pertumbuhan bakteri jenis apapun).

4.6 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat dan bahan.

4.6.1 Identifikasi Bakteri

Alat dan bahan yang digunakan untuk identifikasi bakteri adalah gelas objek, ose, baki pengecatan, mikroskop, lampu spirtus, kultur agar miring yang berumur 24 jam dari *Staphylococcus aureus*, kristal violet, gram iodine, alkohol 95%, safranin, larutan H2O2 3%, larutan *saline* atau *aquadest*, dan plasma darah (Heritage, 2000).

4.6.2 Ekstrak Buah Belimbing Wuluh

Alat pembuatan ekstrak etanol buah belimbing wuluh adalah buah belimbing wuluh, etanol 96%, NaCl, kertas cakram, timbangan analitik, alat penghalus/*blender*, *rotary evaporator*, gelas kimia, cawan petri, tabung reaksi, mikropipet, dan inkubator (Sakinah, 2015).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

Langkah-langkah melakukan pewarnaan gram adalah sebagai berikut (Heritage, 2000):

1) Bersihkan gelas objek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian dibiarkan dingin.
2) Buat sediaan bakteri diatas gelas objek dengan ketebalan yang cukup menggunakan kawat ose yang sudah disterilkan dan biarkan kering. Lalu difiksasi sebanyak tiga kali diatas api bunsen.
3) Tuangi sediaan dengan *crystal violet* lalu dibiarkan selama 1 menit. Buang sisanya, lalu bilas dengan air.
4) Tuangi sediaan dengan gram iodine, biarkan slama 1 menit, lalu buang sisanya dan bilas dengan air.
5) Cuci dengan alkohol 95% tetes demi tetes sebanyak 30 detik atau sampai *crystal violet* terbukti tidak luntur, lalu bilas dengan air.

6) Tuangi sediaan dengan safranin, biarkan selama 30 detik, lalu buang sisa safranin dan bilas dengan air.
7) Keringan sediaan dengan kertas serap.
8) Sediaan ditetesi dengan imersi.
9) Sediaan diamati dibawah mikroskop dengan menggunakan lensa objektif 100x. Hasil positif apabila bakteri tercat ungu.

4.7.1.2 Tes Katalase

Tes katalase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus* dengan *Streptococcus*. Langkah-langkah tes katalase adalah sebagai berikut (Adelberg, 1997) :

1) Ambil satu ose bakteri pada medium NAP.
2) Buat apusan pada gelas objek.
3) Tetesi larutan H2O2 3% pada sediaan.
4) Sediaan diamati, hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung oksigen.

4.7.1.3 Tes Koagulase

Tes koagulase dilakukan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan spesies *Staphylococcus* lainya dan untuk menentukan patogenitas. *Staphylococcus aureus* dinyatakan positif apabila terbentuk gumpalan-gumpalan putih. Langkah-langkah tes koagulase adalah sebagai berikut (Adelberg, 1997) :

1) Gelas objek dibersihkan.
2) Gelas objek ditetesi dengan 1 tetes larutan *saline* atau *aquadest steril* dan ditambahkan 1 koloni bakteri .

3) Kemudian sediaan ditambah dengan 1 tetes plasma darah dan dicampur dengan cara menggoyang kaca objek ke arah melingkar selama 5-10 detik.

4.7.1.4 Suspensi Uji Bakteri

Langkah-langkah pembuatan suspensi bakteri uji adalah sebagai berikut:

1) Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dari NAP menggunakan kawat ose.
2) Bakteri dimasukkan ke tabung reaksi steril yang berisi media cair (*nutrient broth)* lalu diinkubasi pada suhu 37ºC selama 18-24 jam.
3) Dilakukan pemeriksaan spektrofotometri pada hasil kultur medium cair untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi.
4) Untuk mendapatkan hasil konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml yang setara dengan nilai OD sebesar 0,1, digunakan perhitungan sebagai berikut:

$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$

Keterangan:
N1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometer)
Vl = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer
N2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)
V2 = Volume bakteri uji

Dari perhitungan diatas dapat diperoleh volume bakteri (ml) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml. Setelah diperoleh bakteri dengan konsentrasi tersebut, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan

menggunakan *nutrient broth* dan NaCl sehingga diperoleh suspensi bakteri sebanyak 10 ml dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml. Selanjutnya bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Belimbing Wuluh

Metode pembuatan ekstrak buah belimbing wuluh terbagi atas proses pengeringan, proses ekstraksi, dan proses evaporasi, prosesnya adalah sebagai berikut (Nugroho, 2017):

1) Buah belimbing wuluh segar (sampel basah) yang telah dipetik, dicuci bersih dan ditiriskan, kemudian dipotong-potong kecil.
2) Buah belimbing wuluh dikeringan dengan menggunakan oven pada suhu 40ºC-60ºC atau dikeringkan dengan panas matahari. Pembuatan serbuk dilakukan dengan cara memblender buah belimbing wuluh.
3) Pembuatan ekstrak dilakukan dengan merendam 100 gram buah belimbing wuluh kedalam bejana kemudian diberi 1 liter pelarut etanol 96% lalu dikocok (30 menit) dan direndam 1 malam sampai mengendap. Lalu diambil lapisan atas yang merupakan campuran pelarut dan senyawa aktif, dan diulang sebanyak 3 kali.
4) Hasil yang diperoleh dimasukkan pada labu evaporasi 1 liter dan dipasang pada evaporator, pelarut dibiarkan terpisah dengan senyawa aktif.

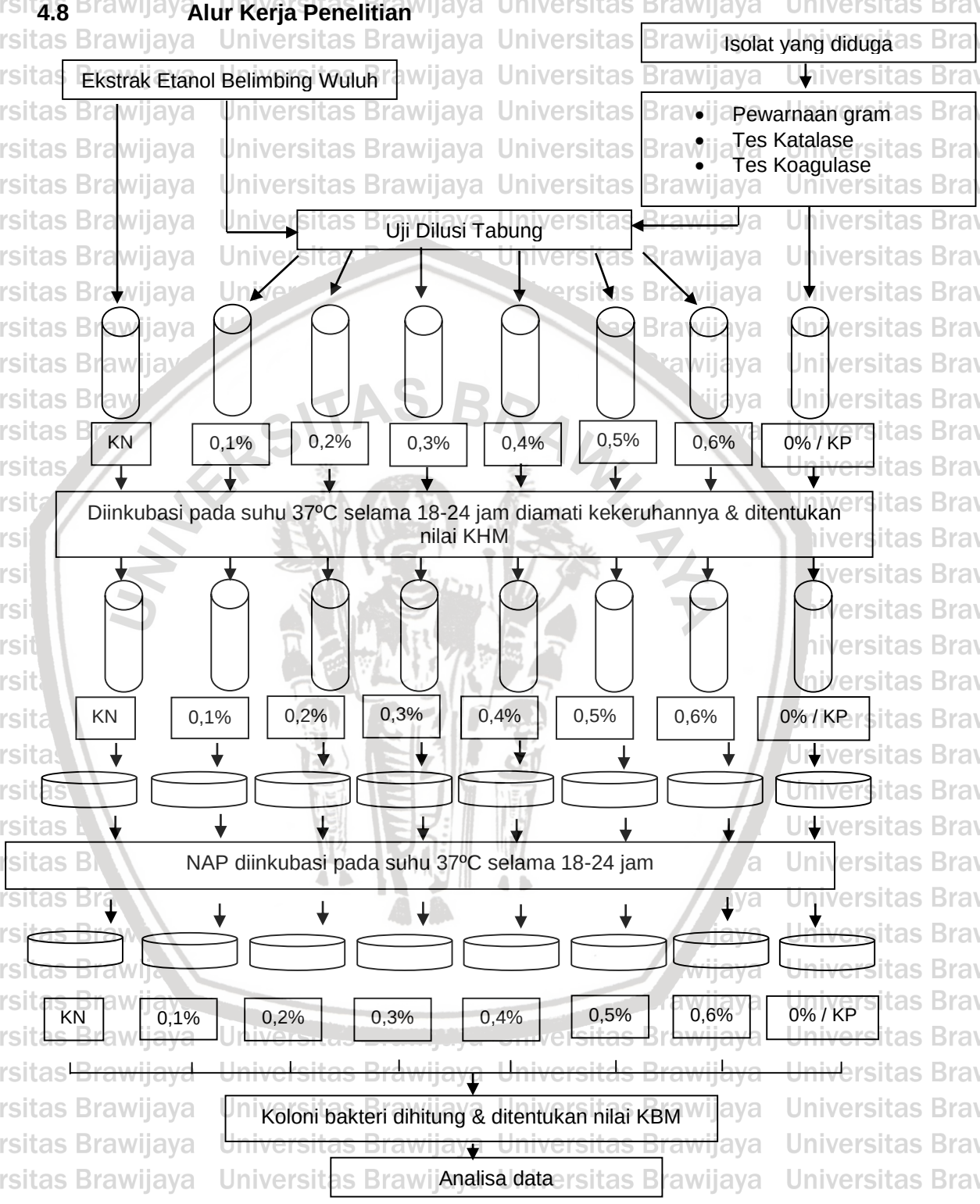
5) Didapatkan hasil ekstraksi yaitu 1/5 dari bahan alam kering, dapat dimasukkan ke botol plastik/ kaca dan disimpan di *freezer*.

4.7.3 Uji Efek Antibakteri

Berikut ini merupakan langkah-langkah uji efek antibakteri ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus*:

1) Disediakan 8 tabung steril, 7 tabung sebagai uji antibakteri, dan 1 tabung sebagai kontrol negatif.
2) Disediakan aquades dan bakteri uji.
3) Dimasukkan aquades dan ekstrak etanol buah belimbing wuluh (berdasarkan konsentrasi diatas) dengan volume tertentu sehingga diperoleh 7 konsentrasi ekstrak yang berbeda-beda.
4) Perbenihan cair bakteri dimasukkan ke dalam masing-masing tabung ekstrak etanol buah belimbing wuluh.
5) Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37ºC selama 18-24 jam.
6) Dicatat pada tabung dengan konsentrasi berapa mulai tampak terjadi kekeruhan. Kadar terendah pada tabung yang menunjukkan tidak ada kekeruhan merupakan KHM.
7) Untuk memperoleh nilai KBM, dilakukan penanaman isi tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (kekeruhan) sebanyak 0,1 ml pada medium NAP. Lalu diinkubasikan pada suhu 37ºC selama 18-24 jam kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri.

4.8 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Buah Belimbing Wuluh terhadap *Staphylococcus aureus*

Keterangan:
KN : Kontrol Negatif
KP : Kontrol Positif

4.9 Pengolahan Data

Data yang diperoleh adalah data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif diperoleh dari melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri secara tidak langsung pada medium. Data kuantitatif diperoleh dari hasil perhitungan jumlah koloni pada medium.

Penelitian ini menggunakan variabel ordinal dengan satu faktor yang ingin diketahui yaitu pertumbuhan koloni bakteri berdasarkan faktor perlakuan pemberian ekstrak etanol buah belimbing wuluh. Uji statistik yang digunakan adalah non-parametrik. Analisis data menggunakan program *Statistical Product of Service Solution* (SPSS) untuk windows. Berikut langkah-langkah analisis data:

1. Uji komparasi untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri. Data diuji menggunakan uji kruskal-wallis dan mann whitney
2. Uji korelasi digunakan untuk mengetahui hubungan variabel independen dan variabel dependen. Uji ini digunakan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan zona inhibisi bakteri. Data digunakan dengan uji spearmann.

BAB 5
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

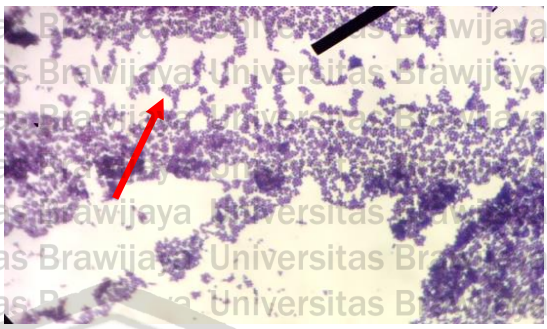
5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)

Ektraksi buah belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dari 2 kg buah belimbing wuluh diperoleh 100 gram simplisia kering. Dengan metode maserasi 100 gram simplisia dengan 2,7 liter pelarut etanol 96% diperoleh ekstrak 19 ml.

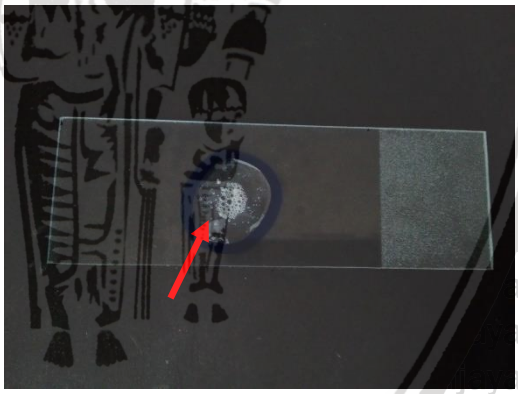
5.1.2 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Penelitian ini menggunakan sampel isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, kemudian dilanjutkan dengan uji identifikasi bakteri yang berupa pengecatan gram, uji katalase, dan uji koagulase, lalu dilanjutkan dengan menentukan konsentrasi untuk mendapatkan Kadar Hambat Minimum (KHM) dengan menggunakan metode dilusi tabung dan mendapatkan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dengan menggunakan media *Nutrient Agar Plate* (NAP).



Gambar 5.1 **Pengecatan Gram dengan Perbesaran 1000x Menunjukkan Gambaran Mikroskopis *S. aureus* bentuk kokus gram positif yang Tersusun atas Kelompok-Kelompok Berwarna Ungu**

Pada pewarnaan gram yang diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x didapatkan adanya bakteri berbentuk kokus, bergerombol seperti anggur, dan bewarna ungu. Sel-sel bakteri yang bewarna ungu menunjukkan pewarnaan gram adalah bakteri gram positif (Gambar 5.1).



Gambar 5.2 **Hasil Tes Katalase Positif (Terdapat Gelembung O_2)**

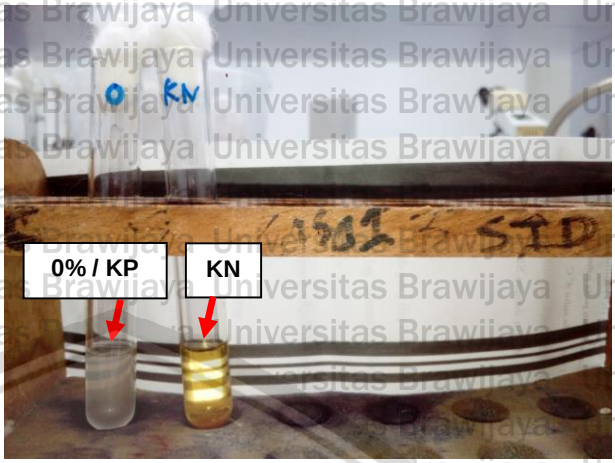
Tes katalase dilakukan untuk membedakan strain *Staphylococcus* dan *Streptococcus*. Tes ini menunjukkan adanya gelembung udara ketika bakteri ditetesi menggunakan hidrogen peroksida (H_20_2) 3%. Hal tersebut menunjukkan uji katalase pada sampel bakteri bernilai positif yang berarti sampel adalah bakteri *Staphylococcus* (Gambar 5.2).

Gambar 5.3 Hasil Tes Koagulase Positif (Terdapat Gumpalan Putih)

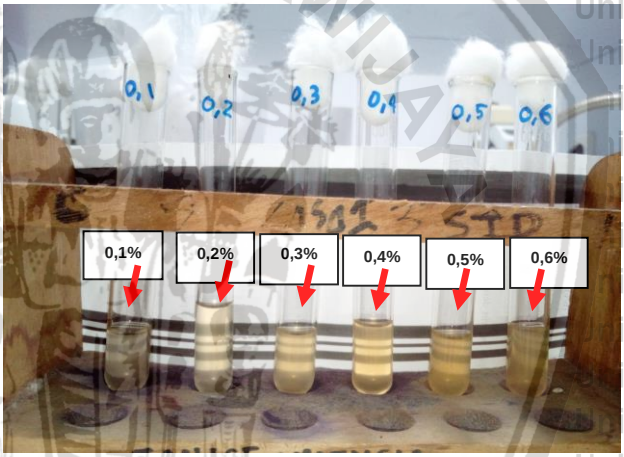
Tes koagulase digunakan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus* jenis lainnya. Tes pada sampel menunjukkan hasil positif karena terdapat gumpalan putih setelah sampel bakteri ditetesi dengan cairan *staphaurex* (Gambar 5.3).

5.1.3 Menentukan Kadar Hambat Minimum

Tahap awal penelitian ini digunakan untuk mengetahui kadar hambat minimum dengan menggunakan ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 0% / KP; KN (Gambar 5.4); 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; dan 0,6% (Gambar 5.5).



Gambar 5.4 **Kontrol Positif (Tabung Berisi Koloni Bakteri Tanpa Ekstrak) dan Kontrol Negatif (Tabung Berisi Ekstrak Tanpa Koloni Bakteri).**



Gambar 5.5 **Hasil Dilusi Tabung Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; dan 0,6%.**

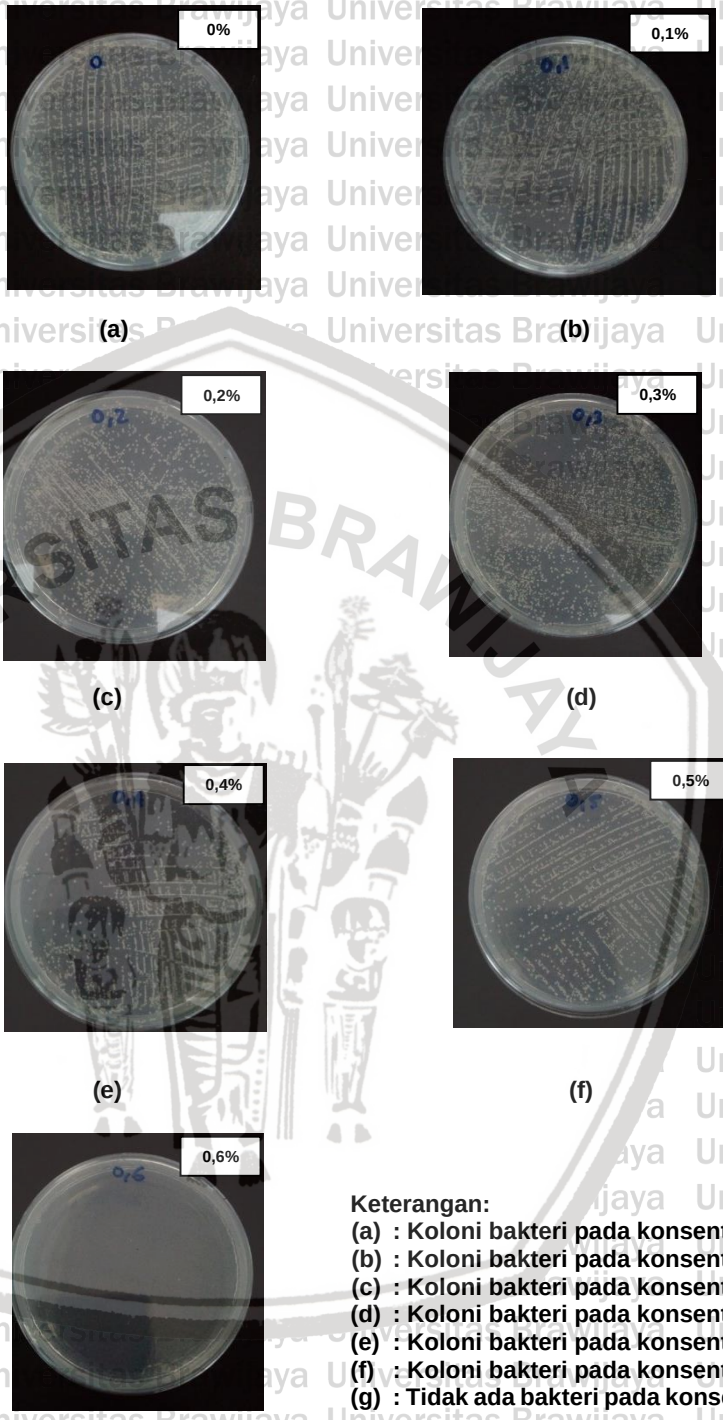
Sebelum dimulai penelitian, dilakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu untuk mendapatkan konsentrasi perlakuan. Konsentrasi yang didapat pada penelitian pendahuluan yaitu 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%, 0,78%; dan 0,39%. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan tersebut didapatkan pada konsentrasi 0,39% (≈0,4%) sudah terdapat penurunan pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Kemudian dilakukan penelitian pendahuluan ulang dengan

perapatan konsentrasi sehingga didapatkan konsentrasi yang tepat pada penelitian ini yaitu 0,6%; 0,5%; 0,4%; 0,3%; 0,2%; dan 0,1%.

Pada penelitian ini dilakukan dengan ditambahkannya bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 1ml lalu diinkubasikan pada suhu 37ºC selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi, terdapat perbedaan tingkat kekeruhan pada ekstrak. Dari pengamatan hasil dilusi tabung (Gambar 5.5) dapat ditentukan kadar hambat minimum (KHM) dengan nilai 0,2%. Semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, menandakan semakin menurunnya pertumbuhan bakteri, terlihat garis yang ada di belakang tabung.

5.1.4 Hasil Pengukuran Kadar Bunuh Minimum

Setelah tabung tersebut diinkubasi dan diamati tingkat kekeruhannya untuk melihat KHM, tiap konsentrasi ekstrak tersebut kemudian di *streaking* sebanyak satu ose ke media NAP/ media agar. Lalu media agar diinkubasi kembali pada suhu 37ºC selama 18-24 jam. Setelah itu, dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada masing masing konsentrasi di media agar dengan menggunakan *colony counter*.



Keterangan:
(a) : Koloni bakteri pada konsentrasi ekstrak 0%
(b) : Koloni bakteri pada konsentrasi ekstrak 0,1%
(c) : Koloni bakteri pada konsentrasi ekstrak 0,2%
(d) : Koloni bakteri pada konsentrasi ekstrak 0,3%
(e) : Koloni bakteri pada konsentrasi ekstrak 0,4%
(f) : Koloni bakteri pada konsentrasi ekstrak 0,5%
(g) : Tidak ada bakteri pada konsentrasi ekstrak 0,6%

Gambar 5.6 Pertumbuhan Koloni Bakteri *Staphylococcus aureus* Di Media Agar NAP dengan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (Tampak Pada Lempeng Agar (g) Konsentrasi 0,6% Tidak Ada Pertumbuhan Koloni Bakteri.

Hasil perhitungan koloni bakteri pada media agar dapat melihat apakah terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni bakteri.

Nilai KBM adalah konsentrasi terendah dari ekstrak yang dapat membunuh bakteri (dimana tidak terdapat pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* pada media agar). Disini nilai KBM dapat terlihat pada konsentrasi 0,6% (Gambar 5.6). Hasil perhitungan koloni bakteri dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Jumlah koloni bakteri terhadap berbagai konsentrasi ekstrak pada media agar

Konsentrasi Akhir	(mean ± SD)	Uji Korelasi P *value*	r
0%	2439152.0 ± 500680.5		
0,1%	148459.2 ± 7309.3		
0,2%	120073.6 ± 27535.9		
0,3%	11731.0 ± 1771.7	0.000	-0.960
0,4%	100.3 ± 18.4		
0,5%	118.5 ± 13.7		
0,6%	0.8 ± 1.0		

Keterangan :
p *value* **:** Nilai Signifikansi
r **:** Koefisien Korelasi

5.2 Analisis Data

5.2.1 Uji Normalitas Data

Uji normalitas digunakan untuk memastikan sebaran data statistik. Nilai signifikansi (p)>0,05 menunjukkan sebaran data normal, sedangkan untuk p<0,05 menunjukkan sebaran data tidak normal. Jika sebaran data normal, maka menggunakan uji

parametrik sedangkan jika data tidak normal maka menggunakan uji non parametrik.

5.2.2 Uji Kruskal-Wallis

Uji non parametrik Kruskal-Wallis dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri setelah diberikan ekstrak pada berbagai tingkat konsentrasi. Adanya perbedaan jumlah koloni yang bermakna ditunjukkan dengan nilai p<0,05. Hasil uji Kruskal-Wallis pada penelitian ini menunjukkan nilai signifikansi bermakna (p=0.000) (Tabel 5.2). Untuk mengetahui secara pasti kelompok perlakuan ekstrak mana yang memiliki perbedaan maka dilakukan uji Mann-Whitney.

Tabel 5.2 Hasil Analisis Kruskal-Wallis

Test Statistics[a,b]

	Colony Counter
Chi-Square	26.091
df	6
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

5.2.3 Uji Mann-Whitney

Uji Mann-Whitney dilakukan untuk melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri terhadap dua macam konsentrasi ekstrak yang berbeda. Perbedaan yang signifikan antara dua konsentrasi ekstrak yang berbeda ditunjukkan dengan p<0.05. Perbedaan antara dua konsentrasi ekstrak yang berbeda dikatakan tidak berbeda signifikan ditunjukkan dengan p>0.05 (lampiran).

Interpretasi dari hasil uji Mann-Whitney (tabel 5.3) adalah sebagai berikut:

1. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi 0% (kontrol) berbeda signifikan dengan konsentrasi 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; dan 0,6%.
2. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi 0,1% berbeda signifikan dengan konsentrasi 0%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; dan 0,6%.
3. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi 0,2% berbeda signifikan dengan konsentrasi 0%; 0,1%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; dan 0,6%.
4. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi 0,3% berbeda signifikan dengan konsentrasi 0%, 0,1%; 0,2%; 0,4%; 0,5%; dan 0,6%.
5. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi 0,4% berbeda signifikan dengan konsentrasi 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,6% dan tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 0,5%.
6. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi 0,5% berbeda signifikan dengan konsentrasi 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,6% dan tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 0,4%.
7. Pertumbuhan koloni bakteri pada konsentrasi 0,6% berbeda signifikan dengan konsentrasi 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; dan 0,5%.

Tabel 5.3 Hasil Ringkasan Analisis Mann-Whitney

	0%	0,1%	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%	0,6%
0%	-	0.021*	0.021*	0.021*	0.021*	0.021*	0.020*
0,1%	0.021*	-	0.043*	0.021*	0.021	0.021*	0.020*
0,2%	0.021*	0.043*	-	0.021*	0.021	0.021*	0.020*
0,3%	0.021*	0.021*	0.021*	-	0.021	0.021*	0.020*
0,4%	0.021*	0.021*	0.021*	0.021*	-	0.149	0.020*
0,5%	0.021*	0.021*	0.021*	0.021*	0,149	-	0.020*
0,6%	0.020*	0.020*	0.020*	0.020*	0.020*	0.020*	-

*** : Berbeda signifikan (p<0.05)**

5.2.4 Uji Korelasi Spearmann

Uji Korelasi Spearmann digunakan untuk mengetahui arah dan seberapa besar hubungan ekstrak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri pada medium agar. Hasil uji menunjukkan nilai signifikansi (p=0.000) sehingga konsentrasi ekstrak memiliki korelasi dengan jumlah koloni bakteri. Selain menghasilkan signifikansi korelasi antara kedua variabel, uji korelasi Spearmann juga menunjukkan koefisien korelasi (r) yang menunjukkan kekuatan korelasi antar dua variabel. Hasil uji korelasi Spearmann (r) = -0.960 dengan demikian terdapat korelasi yang kuat antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah pertumbuhan koloni bakteri dan arah korelasi adalah negatif menunjukkan sifat hubungan berbanding terbalik, artinya semakin besar konsentrasi ekstrak pada medium agar, maka semakin rendah pula pertumbuhan koloni bakteri (lampiran).

BAB 6
PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Buah belimbing wuluh dipilih karena buah belimbing wuluh mengandung berbagai senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri yang dapat menyebabkan berbagai penyakit pada manusia.

Bahan alam yang digunakan pada penelitian ini yaitu buah belimbing wuluh yang diekstrak dengan etanol 96% dengan metode maserasi. Larutan etanol sangat bagus digunakan sebagai pelarut buah belimbing wuluh karena senyawa aktif yang terkandung pada buah belimbing wuluh seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin yang cenderung larut dalam etanol. Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan berasal dari *stock culture* milik Laboratorium Mikrobiologi Klinik Universitas Brawijaya Malang. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri diidentifikasi terlebih dahulu.

Dari hasil penelitian didapatkan kadar hambat minimum (KHM) melalui tabung hasil inkubasi dengan menggunakan ekstrak etanol buah belimbing wuluh terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Konsentrasi yang digunakan adalah 0%/ KP; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; dan 0,6%. Dari hasil pengamatan didapatkan pada konsentrasi 0,2% sudah mulai terlihat KHM. Selanjutnya tiap konsentrasi pada tabung tersebut dilakukan s*treaking* pada media NAP/ media

agar yang telah diinkubasi pada suhu 37ºC selama 18-24 jam kemudian dapat ditentukan kadar bunuh minimum (KBM) dengan menghitung pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada tiap konsentrasi. Pada hasil inkubasi bakteri pada media agar ini diperoleh koloni bakteri pada konsentrasi 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; dan 0,5%; sedangkan pada konsentrasi 0,6% didapatkan pertumbuhan bakteri sangat rendah atau bahkan bakteri tidak tumbuh sama sekali. Dengan demikian dinyatakan bahwa nilai KBM pada konsentrasi 0,6%. Pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* cenderung menjadi semakin sedikit ketika diberikan konsentrasi ekstrak etanol buah belimbing wuluh yang tinggi.

Telah dilakukan penelitian lain oleh Elmarda (2017) yang menguji ektrak etanol buah belimbing wuluh terhadap bakteri *Escherichia coli*. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian tersebut adalah 0,19%; 0,39%; 0,78%; 1,0%; 1,56%; dan 3,12%. Efektivitas ekstrak etanol buah belimbing wuluh pada penelitian tersebut ditunjukkan pada nilai KHM dan KBM dengan konsentrasi sebesar 1,56%. Hasil KHM dan KBM pada konsentrasi ekstrak etanol yang digunakan pada penelitian yang dilakukan oleh Elmeralda (2017) tersebut lebih tinggi daripada hasil KHM dan KBM yang dilakukan oleh peneliti, hal tersebut karena bakteri yang diuji pada peneltian Elmerada (2017) adalah bakteri gram negatif, sehingga membutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi. Dari hasil tersebut ditunjukkan pula oleh penelitian Kumar (2013) bahwa ekstrak etanol buah belimbing wuluh sangat potensial digunakan sebagai antibakteri pada bakteri gram positif dan gram negatif. Namun, bakteri gram positif lebih rentan terhadap

ekstrak etanol buah belimbing wuluh jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Beberapa hasil penelitian menggunakan ekstrak tanaman lain yang memiliki sifat antibakteri terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Yuliani (2011) mengenai antibakteri minyak atsiri daun jeruk purut (*Citrus hystrix)* menggunakan metode dilusi tabung dengan konsentrasi 0,0625%; 0,125%; 0,25%; 0,5%; 1%; dan 2% dan didapatkan nilai KHM dan KBM pada konsentrasi 2%. Hasil penelitian lain dilakukan oleh Leman (2016) yang menguji potensi antibakteri air perasan bawang putih (*Allium sativum L.*) dengan konsentrasi 0,39%; 0,78%; 1,56%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100% kemudian nilai KHM didapatkan pada konsentrasi 3,125% dan nilai KBM pada konsentrasi 6,25%. Selain itu, dilakukan pula penelitian oleh Suryani (2007), menguji ekstrak batang siwak (*Salvadora persica*) dengan kosentrasi sebesar 0,098%; 0,195%; 0,391%; 0,781%; 1,563%; 3,125%; 6,25%; dan 12,5%, lalu didapatkan nilai KHM pada konsentrasi 6,25% dan KBM pada konsentrasi 12,5%. Beberapa hasil penelitian tersebut mengindikasikan ekstrak etanol buah belimbing wuluh lebih efisien dalam hal menghambat pertumbuhan koloni bakteri khususnya *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan ekstrak minyak atsiri daun jeruk purut (*Citrus hystrix*), air perasan bawang putih (*Allium sativum L.*), dan ekstrak batang siwak (*Salvadora persica*), dikarenakan pada tanaman belimbing wuluh pada konsentrasi yang lebih rendah mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu dengan nilai KHM sebesar 0,2% dan nilai KBM sebesar 0,6%

Dari hasil analisis data digunakan uji normalitas dan uji komparasi untuk mengetahui adanya pengaruh ekstrak terhadap pertumbuhan koloni bakteri sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0.05$). Kemudian digunakan uji korelasi Spearmann menunjukkan nilai signifikan ($p=0.000$). Maka dapat dinyatakan bahwa terdapat korelasi yang kuat antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah pertumbuhan koloni bakteri. Keeratan hubungan tersebut sebesar 0,960 dan dapat dinyatakan korelasi bersifat negatif dan kuat.

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data diatas dapat dinyatakan bahwa ekstrak buah belimbing wuluh memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin sedikit koloni bakteri yang tumbuh. Dengan demikian hipotesis penelitian terbukti benar.

Berdasarkan hal tersebut, dapat diketahui bahwa buah belimbing wuluh ternyata dapat bermanfaat bagi kesehatan. Kandungan senyawa aktif pada buah belimbing wuluh berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini memiliki korelasi yang kuat antar variabel saat dilakukan uji statistik namun penelitian ini memiliki kelemahan yaitu masih sulit diaplikasikan secara klinis.

Meskipun pada penelitian ektrak etanol buah belimbing wuluh memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai farmakokinetik, farmakodinamik, dan efek toksik dari kandungan senyawa aktif dalam buah belimbing wuluh sebelum digunakan sebagai pengobatan alternatif secara *in vivo* atau pada hewan coba. Penelitian

lebih lanjut ini perlu dilakukan untuk mendasari pengaplikasikan secara klinis pada manusia, terutama sebagai terapi alternatif terhadap berbagai penyakit infeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Selain itu, kegunaan ekstrak etanol buah belimbing wuluh juga memiliki potensi sebagai antibakteri yang bersifat luas, dapat dilakukan penelitian serupa untuk mengetahui efek antibakteri terhadap bakteri lain selain *Staphylococcus aureus*.

BAB 7
PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah:

1. Didapatkan dosis konsentrasi ekstrak etanol buah belimbing wuluh sebesar 0%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,6%.
2. Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak sebagai antibakteri terhadap bakteri adalah 0,2%.
3. Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak sebagai antibakteri terhadap bakteri adalah 0,6%.

7.2 Saran

Saran yang dapat peneliti berikan berdasarkan penelitian ini adalah:

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pengaplikasian ekstrak etanol buah belimbing wuluh yang efektif untuk dikonsumsi masyarakat sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kadar dari masing-masing senyawa aktif dalam buah belimbing wuluh yang berperan besar sebagai antibakteri terhadap bakteri uji.

3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek ekstrak etanol buah belimbing wuluh secara in vivo (pada hewan coba) untuk melihat farmakokinetik, farmakodinamik, dan efek toksik dari kandungan senyawa aktif dalam buah belimbing wuluh dan *clinical trial* pada manusia sebelum digunakan sebagai keperluan pengobatan alternatif.

DAFTAR PUSTAKA

Adelberg, E., Melnick, J., Jawetz, E,. 1997. *Review of Medical Microbiology*. Terjemahan oleh Gerard Bonang. Universitas Atmajaya, Jakarta. Hal 256-262.

Ariharan, V.N., Kalirajan, K., Nagendra, P. 2012. An Exotic Fruit With Forms The New Natural Source For Vitamin-C. *Rasayan J Chem*, 5(3): 356-359.

Brooks, G., Morse, S. 2001. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 25th edition. McGraw-Hill Medical, New York. Hal. 78-81, 317-326.

Brown, D.F.J., Edward, D.I., Hawkey, P., Morrison, D. 2005. Guidelines For The Laboratory Diagnosis and Suspectibility Tersting of *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemoteraphy*, 56(6): 1000-1018.

Carrol, K.C., Morse, S.A., Mietzner, T., and Miller, S. 2016. *Jawetz Melnick & Adelberg Medical Microbiology,* 27th Ed, McGraw-Hill Education, USA. Hal. 45, 89-91, 157-160.

Chamberlain, N. 2017. Photo Gallery of Bacterial Pathogens. (Online) https://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/website/gallery.htm,diakses pada tanggal 12 Desember 2017.

Cowan, M.M. 1999. Plants Product as Microbial Agent. *Clinical Microbiology Review*, 12(4): 564-582.

Dasuki, U. 1991. *Sistematika Tumbuhan Tinggi*. Pusat Universitas Ilmu Hayati ITB, Bandung. Hal. 90.

Dzen, S.M., Roekistiningsih. 2003. *Bakteriologi medik*. Bayumedia Publishing, Malang. Hal. 134-139.

Gillespie, S., Kathleen, B. 2012. *Medical Microbiology and Infection at a Glance.* 4th Ed. John Wiley & Sons, Southern Gate. Hal. 32-33.

Elmarda, R. Widhianto, E. 2017. Effectivity In Vitro of *Averrhoa bilimbi L.* Ethanol Extract Againts *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Growth. (Online Journal). Hal.140-148. https://www.researchgate.net/publication/320893786_Effectivity_in_vitro_of_Averrhoa_bilimbi_L_Ethanolic_Extract_Againts_Escherichia_coli_and_Staphylococcus_aureus_Growth, diakses pada tanggal 1 November 2018.

Hassim, N. 2014. Solvent Selection in Extraction of Essential Oil and Bioactive Compounds from *Polygonum minum*. *Journal of Applied Sciences*, 14(13): 1440-1444.

Hilpert, K. 2008. Agar and Broth Dilution Methods to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances. *Nature Protocol*, 3(2): 163-175.

Heritage, J., Killington, R.A. 2000. *Introductory Microbiology*. Cambridge University Press, United Kingdom. Hal 96-100.

Karou, D., Savadogo, A., Yameogo, S., Canini, A., Montesano, C., Simpore, J. 2006. Antibacterial Activity of Alkaloid from Sida acuta. *African Journal of Biotechnology*, 5(2):195-200.

Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M. 2005. *Medical Microbiology*. Thieme Stuttgart, New York. Hal. 230-234.

Kumar, S. 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientist World Journal*. 1(2): 11-13.

Kunaepah, U. 2008. *The Effect of Fermentation Duration and Glucose Concentration on Antibacterial Activity, Total Polyphenol, and Chemical Quality of Kidney Bean Milk Kefir*. Tesis. Diterbitkan, Program Studi

Magister Gizi Masyarakat, Program Pacasarjana Universitas Diponegoro, Semarang. Hal. 25-26.

Leman, M. 2016. Potensi Antibakteri Air Perasan Bawang Putih (*Allium sativum L.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon*, 5(4): 77-89.

Liantari, D. 2014. Effect of Wuluh Starfruit Leaf Extract for *Streptococcus mutans* growth. (Online journal) Juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/majority/article/download/490/491, diakses pada tanggal 4 Desember 2017.

Lisdawati. 2002*. Buah Mahkota Dewa, Toksisitas, Efek Antioksidan, dan Uji Penapisan*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Litbangkes. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia,* Edisi ke-1, Jilid 1. Depkes RI, Jakarta.

Loekito, H.H. 1998. *Rancangan Percobaan.* IKIP, Malang.

Naim. 2004. *Senyawa Antimikroba dari Tumbuhan*. Institut Pertanian Bogor, Bogor. Hal. 21-24.

Nair, M. Singh, V. 2016. Anticancer Activity of Fruit and Leaf Extract of *Averrhoa bilimbi* on MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines: A Preliminary Study. *Austin J Pharmacol Ther,* 4(2): 1-5.

Nugroho, A. 2017. *Buku Ajar: Teknologi Bahan Alam.* Lambung Mangkurat University Press. Banjarmasin. Hal. 72-89.

Plantamor. 2016. Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). (Online) http://www.plantamor.com/katalog/tanaman-buah_1/belimbing-wuluh_i109 diakses pada tanggal 12 Desember 2017.

Plata, K., Rosato, A. E., Wegrzyn, G. 2009. *Staphylococcus aureus* as an Infection Agent: Overview of Biochemistry and Molecular Genetics of it Pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*, 56(4): 597-612.

Radji, M. 2011. Antibiotic Sensitivity Pattern of Bacterial Pathogens in the Intensive Care Unit of Fatmawati Hospital Indonesia. *Asian Pac J Trop Biomed*, 1(1): 39-42.

Rahmiati, A., Darmawati, S. Daya Hambat Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* Secara *in vitro.* (Online), http://jurnal.unimus.ac.id/index.php/psn12012010/article/viewFile/2957/2879 , diakses pada tanggal 20 Desember 2017.

Robinson, T. 1998. *The Biochemistry of Alkaloid*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. New York. Hal. 120-122.

Roy, A., Geetha, R.V. 2011. *Avverhoa bilimbi Linn*- Nature's Drug Store- A Pharamacological Review. *Journal of Drug Development & Research*, 3(3): 101-106.

Sari, F.P. Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha multifida Linn*) sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami. (Online) http://eprints.undip.ac.id/36753/1/54.Artikel1.pdf, diakses pada tanggal 4 Desember 2017.

Sakinah, S. 2015. Uji Perbandingan Aktivitas Antijamur *Pitysporum ovale* dari Kombinasi Ekstrak Etanol Buah Belimbing Wuluh (*Avverhoa bilimbi L.*) dan Daun Sirih (*Piper betle*) dengan Ketokonazol 2%. *Media Farmasi*, 12(1): 66-82.

Severin, J. 2008. Unusually High Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin Genes among Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains Carried in the Indonesian Population. *J. Clin. Microbiol*, 46(6): 1989-1995.

Soedarto. 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Sagung Seto, Jakarta. Hal. 194-211.

Suliani, Ana., Latief, Widyawati. 2016. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etil Asetat Buah dan Daun Belimbing Wuluh Terhadap Mikroba Salmonella tyhipimurium dan Aspergillus flavus. *Chempublish Journal*, 1(2): 5.

Suryani, L. 2007. The Minimal Inhibitory Concentration of Extract Siwak (*Salvadora persica) Against Staphylococcus aureus*. *Mutiara Medika*, 7(1): 7-12.

Tohir, K. A. 1981. *Pedoman Bercocok Tanam Pohon Buah-Buahan*. Pradnya Paramita,Jakarta. Hal. 328.

Yuliani, R. 2011. Antibacterial Activity of Volatil Oil of Small Aromatic Lemon Leaves (*Citrus* hystrix) *Against Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Pharmacon*, 12(2): 50-54.