



UJI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP *Lactobacillus acidophilus* SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

Oleh
Kintan Jettanurul Maharani
NIM 181610101099

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2022



**UJI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP *Lactobacillus acidophilus*
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar sarjana Kedokteran Gigi

Oleh
Kintan Jettanurul Maharani
NIM 181610101099

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2022

PERSEMBAHAN

Atas izin Allah SWT, skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Keluarga saya tercinta Ibu Sri Munarti dan Bapak Hery Yuliawan dan Bapak Sudarmadji dan keluarga besar yang selalu menjadi semangat saya untuk menjalankan segala sesuatu;
2. Guru-guru dan dosen-dosen yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan kepada saya;
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
4. Untuk yang terakhir saya persembahkan untuk diri saya sendiri yang sudah berjuang hingga saat ini.

MOTTO

"Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan."

(QS. Al Insyirah 5-6)*)

“Dan Barangsiapa bertakwa kepada Allah, niscaya Dia menjadikan kemudahan baginya dalam urusannya”

(QS. At Thalaq 4.)*)

“Dan bermimpi saja tidak akan pernah cukup. Dan sebuah impian memang seharusnya tidak perlu terlalu banyak dibicarakan, tetapi diperjuangkan”

(Donny Dirghantoro)**)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2017. *Al-Qur'an dan terjemahan Dilengkapi Panduan Waqaf & Ibtida'*. Jakarta : PT. Suara Agung.

***) Donny Dirghantoro. 2011. 2. Jakarta Pusat : Grasindo.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Kintan Jettanurul Maharani

NIM : 181610101099

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap *Lactobacillus acidophilus* Secara *In Vitro*”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjungtinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 22 Juni 2022

Yang menyatakan,

Kintan Jettanurul Maharani

NIM 181610101099

SKRIPSI

UJI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP *Lactobacillus acidophilus* SECARA *IN VITRO*

Oleh
Kintan Jettanurul Maharani
NIM 181610101099

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : drg. Pudji Astuti, M.Kes
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap *Lactobacillus acidophilus* Secara *In Vitro*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada:

hari, tanggal : Rabu, 22 Juni 2022

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dosen Penguji Ketua,

Dosen Penguji Anggota,

drg. Sri Lestari, M.Kes.
NIP. 196608191996012001

drg. H. A. Gunadi, M.S, Ph. D.
NRP. 760021013

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Pendamping,

drg. Pudji Astuti, M.Kes.
NIP. 196810201996012001

drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes.
NIP. 197608092005012002

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros
NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap *Lactobacillus acidophilus* Secara *In Vitro*; Kintan Jettanurul Maharani; 181610101099; 2022; 108 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Karies merupakan penyakit gigi dan mulut dengan prevalensi kejadian yang cukup tinggi. Salah satu penyebab karies adalah bakteri yakni *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) dan *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*). *L. acidophilus* merupakan bakteri dominan pemicu perkembangan karies gigi lanjut setelah terbentuknya lesi awal karies. Hal ini disebabkan oleh karena faktor virulensinya berupa ekstraselular polisakarida (EPS), asam laktat, dan protein *surface layer* (*S-Layer*) yang mempermudah bakteri untuk menempel pada gigi. Upaya untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri kariogenik tersebut adalah pemberian obat kumur klorheksidin 0,2% yang digunakan dalam jangka panjang tanpa pengawasan dokter dapat menimbulkan beberapa efek samping. Sehingga diperlukan obat kumur berbahan alami yang dapat meminimalisir efek samping tersebut. Salah satu tanaman obat dengan kemampuan antibakteri yaitu daun pegagan yang memiliki kandungan aktif antibakteri berupa flavonoid, tannin, steroid, saponin, terpenoid, dan alkaloid. Sehingga hal tersebut yang melatarbelakangi penulis untuk meneliti efek antibakteri dari ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus* melalui uji antibakteri dengan metode difusi cakram yang diimplementasikan dengan melihat zona hambat yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang telah ditetesi ekstrak daun pegagan. Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Kelompok penelitian ada 5 yaitu kontrol positif (klorheksidin (CHX) 0,2%), kontrol negatif (akuades), kelompok perlakuan ekstrak daun pegagan konsentrasi 50%, 75%, dan 100%. Ekstrak daun pegagan dibuat dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Uji antibakteri dilakukan dengan menempatkan *paper disk* sesuai kelompok penelitian pada media MRS-A berisi *L. acidophilus*. Kemudian diinkubasi dan diamati

menggunakan jangka sorong digital oleh 3 orang pengamat. Hasil data dianalisis uji normalitas *Saphiro Wilk*, uji homogenitas *Levene Test*, uji *One-Way Anova*, dan uji *Post Hoc LSD*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% memiliki efek antibakteri terhadap *L.acidophilus*. Hasil rerata diameter zona hambat yaitu K+ (10,98 mm), K- (0 mm), ekstrak daun pegagan konsentrasi 50% (8,80 mm), konsentrasi 75% (10,35 mm), dan konsentrasi 100% (11,12 mm). Uji *One-Way Anova* menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$ yang berarti bahwa seluruh kelompok penelitian memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil rerata diameter zona hambat menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun pegagan maka semakin besar potensi antibakteri terhadap *L. acidophilus*, meskipun pada uji *Post Hoc LSD* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara konsentrasi 75% dan 100%, tetap menunjukkan adanya kecenderungan kenaikan rerata diameter zona hambat. Hasil uji *Post Hoc LSD* antara kelompok CHX 0,2% dengan ekstrak daun pegagan konsentrasi 75%, kelompok CHX 0,2% dengan ekstrak daun pegagan konsentrasi 100%, serta ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% dengan konsentrasi 100% menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan bahwa antarkelompok tersebut memiliki kemampuan efek antibakteri yang setara atau hampir sama. Sehingga dapat disimpulkan ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% dan 100% memiliki kemampuan antibakteri setara CHX 0,2% terhadap *L. acidophilus*. Aktivitas antibakteri tersebut diduga disebabkan oleh karena kandungan zat kimia aktif didalamnya seperti flavonoid, tannin, saponin, steroid, terpenoid, dan alkaloid yang persentase jumlah kandungannya dipengaruhi oleh faktor internal dan faktor eksternal.

PRAKATA

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh, Bismillahirrohmanirrohim

Segala puji bagi Allah SWT atas segala nikmat dan anugerah-Nya yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap *Lactobacillus acidophilus* Secara *In Vitro*” sebagai persyaratan penyelesaian Program Sarjana (S1) Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari doa, bantuan, bimbingan, serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT, atas limpahan nikmat, rahmat, karunia, dan hidayahNya yang tidak terputus kepada hambanya;
2. Orang tua saya, Ibu Sri Munarti, Bapak Hery Yuliawan, dan Bapak Sudarmadji yang selalu mendoakan, mendukung, dan memberi perhatian yang terbaik untuk penulis;
3. Keluarga besar juga kakek nenek yang selalu mendukung penulis;
4. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
5. Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp.OF (K). selaku Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
6. drg. Rendra Chriestedy P., MDS.c. selaku Wakil Dekan II Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. drg. Dwi Kartika Apriyono, M. Kes. selaku Wakil Dekan III Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
8. drg. Pudji Astuti, M. Kes. selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang senantiasa sabar membimbing, meluangkan waktu, perhatian, tenaga dan pikirannya dalam penulisan skripsi ini. Terima kasih banyak Dokter;

9. drg. Sri Lestari, M. Kes selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. H. A. Gunadi, M. S, Ph.D. Selaku Dosen Penguji Anggota yang senantiasa selalu sabar memberikan saran dan kritik untuk menyempurnakan isi skripsi ini dan menambah ilmu pengetahuan penulis. Terima kasih banyak Dokter;
10. drg. Dewi Kristiana, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang sudah banyak membantu dan sangat sabar dalam membimbing penulis;
11. Staff akademik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah membantu perizinan penelitian sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
12. Staff Laboratorium Tanaman Jurusan Produksi Pertanian Politeknik Negeri Jember; Staff Laboratorium Bioscience; Ibu Indri, selaku Staff Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember;
13. Tim Pegagan yaitu Wina dan Nada, serta Tim *Lactobacillus acidophilus* yaitu Yogi, Maudy, Arlin terima kasih sudah berjuang bersama dan atas bantuan dan kerja samanya;
14. Sahabat saya, Aprodita, Sofinatur, Clay, Esti, Dyah, Mia, Nadia, Sari, Weny, Alvira dan teman teman InsyaAllah Berkah atas segala bentuk perhatian, dukungan dan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini;
15. Teman seperjuangan selama di FKG yaitu Tutorial I, Tutorial J, Eldentium Angkatan 2018 FKG Universitas Jember; dan semua pihak yang telah terlibat yang tidak bisa penulis sebutkan satu-persatu.
16. *Last but not least, I wanna thank me for believing in me, for doing all this hard work, for having no days off, for never quitting, for always being a giver and tryna give more than I receive, I wanna thank me for just being me all the times.*

Penulis telah berusaha semaksimal mungkin dalam penyelesaian skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada bangsa, negara, agama, dan masyarakat luas.

Jember, 22 Juni 2022

Kintan Jettanurul Maharani

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Karies Gigi	6
2.1.1 Definisi Karies Gigi.....	6
2.1.2 Etiologi Karies Gigi.....	6
2.1.3 Patogenesis Karies Gigi.....	10
2.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	11
2.2.1 Taksonomi.....	11
2.2.2 Karakteristik dan Morfologi.....	12
2.2.3 Mekanisme <i>L. acidophilus</i> Penyebab Karies Gigi.....	14
2.3 Daun Pegagan	15
2.3.1 Taksonomi.....	15
2.3.2 Morfologi.....	16
2.3.3 Habitat.....	20
2.3.4 Kandungan dan Manfaat.....	21

2.4	Klorheksidin (<i>CHX</i>).....	24
2.5	Uji Antibakteri.....	26
2.6	Ekstraksi.....	27
2.6.1	Metode Ekstraksi Konvensional.....	27
2.6.2	Metode Ekstraksi Modern.....	28
2.7	Kerangka Konsep.....	30
2.8	Penjelasan Kerangka Konsep.....	31
2.9	Hipotesis.....	32
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	32
3.1	Jenis Penelitian.....	34
3.2	Rancangan Penelitian.....	34
3.3	Waktu dan Tempat Penelitian.....	34
3.3.1	Waktu Penelitian.....	34
3.3.2	Tempat Penelitian.....	34
3.4	Variabel Penelitian.....	34
3.4.1	Variabel Bebas.....	34
3.4.2	Variabel Terikat.....	35
3.4.3	Variabel Terkendali.....	35
3.5	Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	35
3.5.1	Ekstrak Daun Pegagan.....	35
3.5.2	<i>L. acidophilus</i>	35
3.5.3	Daya Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (<i>C. asiatica</i>).....	35
3.6	Sampel Penelitian.....	36
3.6.1	Pengelompokan Sampel.....	36
3.6.2	Jumlah Sampel.....	36
3.6.3	Kriteria Sampel.....	37
3.7	Alat dan Bahan Penelitian.....	37
3.7.1	Alat Penelitian.....	37
3.7.2	Bahan Penelitian.....	38
3.8	Prosedur Penelitian.....	39
3.8.1	Tahapan Persiapan.....	39
3.8.2	Uji Antibakteri.....	45

3.8.3 Pengukuran Diameter Zona Hambat.....	46
3.9 Analisis Data.....	47
3.10 Alur Penelitian.....	48
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	49
4.1 Hasil Penelitian.....	49
4.2 Analisis Data.....	50
4.3 Pembahasan.....	53
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	60
5.1 Kesimpulan.....	60
5.2 Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA.....	61
LAMPIRAN.....	73

DAFTAR TABEL

	Halaman
2. 1 Komponen kimia daun pegagan.....	21
4. 1 Hasil rerata dan simpangan baku diameter zona hambat (mm) ekstrak daun pegagan (<i>C. asiatica</i>) terhadap <i>L. acidophilus</i>	50
4. 2 Hasil uji normalitas <i>Saphiro-Wilk</i>	51
4.3 Hasil uji homogenitas data <i>Levene Test</i>	51
4.4 Hasil uji <i>One-Way ANOVA</i>	52
4.5 Hasil uji <i>Post Hoc LSD</i>	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Gambaran klinis karies gigi lanjutan berwarna coklat kehitaman.....	6
2.2 Etiologi karies gigi.....	7
2.3 Mekanisme karies gigi.....	10
2.4 <i>Scanning Electron Micrograph</i> dengan Perbesaran 10.000x pada <i>L. acidophilus</i>	12
2.5 Tanaman pegagan	16
2.6 Morfologi daun pegagan	18
2.7 Tangkai pegagan (<i>petiole</i>)	18
2.8 Bagian yang ditunjuk panah hitam merupakan stolon pegagan	19
2.9 Morfologi akar pegagan	19
2.10 Morfologi pegagan	20
2.11 Struktur kimia <i>Centella asiatica</i>	21
2.12 Kerangka konsep.....	30
3.1 Kriteria pengukuran daun pegagan pada penelitian.....	37
3.2 Ilustrasi pemberian label pada <i>petridish</i> penelitian.....	44
3.3 Ilustrasi <i>streak method</i> pada media MRS-A di <i>petridish</i> dengan tiga kali putaran dengan sudut 60° searah jarum jam	45
3.4 Ilustrasi pengukuran diameter zona hambat.....	47
3.5 Diagram Alur Penelitian.....	47
4.1 Zona hambat perlakuan kontrol positif, kontrol negatif, ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% terhadap <i>L. acidophilus</i> yang terbentuk di sekeliling kertas cakram.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 3.1 Sertifikat <i>Lactobacillus acidophilus</i>	73
Lampiran 3.2 <i>Ethical Clearance</i>	75
Lampiran 3.3 Surat Identifikasi Daun Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	76
Lampiran 3.4 Surat Izin Penelitian.....	77
Lampiran 3.5 Surat Keterangan Selesai Penelitian.....	80
Lampiran 3.6 Alat Penelitian.....	82
Lampiran 3.7 Bahan Penelitian.....	84
Lampiran 3.8 Pembuatan Ekstrak Daun Pegagan.....	85
Lampiran 3.9 Prosedur Uji Antibakteri dengan metode <i>Disk Diffusion</i>	86
Lampiran 4.1 Foto Hasil Penelitian	87
Lampiran 4. 2 Tabel Hasil Penelitian.....	89
Lampiran 4. 3 Uji Statistik Menggunakan SPSS Versi 25.....	90

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Masalah kesehatan gigi dan mulut merupakan masalah yang paling banyak ditemui pada masyarakat dunia, tak terkecuali di Indonesia. WHO (*World Health Organization*) menyebutkan hampir 100% masyarakat dunia usia dewasa mengalami karies gigi (Ahirwar *et al.*, 2019). Berdasarkan data RISKESDAS (Riset Kesehatan Dasar) tahun 2018 disebutkan bahwa sekitar 57,6% masyarakat Indonesia memiliki masalah kesehatan gigi dan mulut, 88,8% diantaranya mengalami karies gigi dan 56,6% mengalami kasus karies mencapai akar gigi (Kemenkes RI, 2018).

Karies gigi merupakan kerusakan yang terjadi pada jaringan keras gigi akibat dari aktivitas fermentasi karbohidrat oleh bakteri penghasil asam yang dapat memicu proses demineralisasi gigi. Demineralisasi yang tidak diimbangi dengan remineralisasi pada gigi akan menyebabkan kerusakan pada jaringan keras gigi (Setiani *et al.*, 2020). Karies gigi disebabkan oleh beberapa faktor, salah satunya peran interaksi bakteri penyebab karies gigi. Berdasarkan penelitian sebelumnya, bakteri yang dimaksud adalah *S. mutans* dan *L. acidophilus*. *S. mutans* merupakan bakteri yang berperan dalam proses inisiasi awal terbentuknya lesi karies, sedangkan *L. acidophilus* merupakan bakteri yang berperan sebagai penyebab perkembangan karies lanjut tersebut (Zubaidah *et al.*, 2018).

L. acidophilus merupakan bakteri Gram positif anaerob fakultatif berbentuk batang yang bersifat *non-motil* dan *non-spora* (Ahirwar *et al.*, 2019). Bakteri dengan genus *Lactobacillus* ini merupakan bagian dari jenis bakteri homofermenter yang berarti bahwa bakteri ini dapat memproduksi asam laktat sebesar 65% dari fermentasi glukosa (Samaranayake, 2018). Bakteri ini sangat jarang ditemukan pada saat sebelum munculnya lesi karies maupun lesi awal karies, namun sangat banyak ditemukan sebagai inisiator proses formasi perkembangan lebih lanjut dari suatu karies gigi. Bakteri ini juga banyak ditemukan pada saliva pasien dengan kasus karies gigi lanjut (Nurhalisa *et al.*, 2020).

Upaya pemeliharaan kesehatan gigi dan mulut melalui pencegahan karies gigi dapat dilakukan dengan pemberian obat kumur yang mengandung bahan antibakteri. Obat kumur merupakan larutan antiseptik yang dapat membantu meningkatkan kebersihan rongga mulut dan mengurangi bau mulut (Handayani *et al.*, 2016). Pemberian obat kumur yang mengandung antibakteri ini terbukti sangat efektif dalam mencegah terjadinya pembentukan plak. Salah satu material penyusun plak yaitu matriks EPS yang berperan dalam pembentukan matriks biofilm yang diperlukan bakteri untuk menempel pada gigi. *L. acidophilus* merupakan salah satu bakteri yang memiliki matriks EPS sehingga dapat menyebabkan terbentuknya plak dan perkembangan karies gigi lanjut (Juliantoni dan Wirasisya, 2018; Karpinska dan Szakaradkiewicz, 2021).

Penambahan kandungan zat antibakteri pada obat kumur dapat mengurangi terjadinya perlekatan bakteri karies pada permukaan gigi. Zat antibakteri yang sering digunakan pada obat kumur digolongkan menjadi dua, yaitu berbahan dasar kimia sintesis atau tiruan dan berbahan dasar zat kimia aktif dari tumbuhan alami. Berdasarkan Mirawati (2017), berbagai jenis obat kumur berbahan sintesis saat ini banyak beredar di pasaran, salah satu bahan yang sering digunakan adalah klorheksidin yang bersifat bakteristatik dan bakterisidal pada bakteri Gram positif maupun negatif. Obat kumur klorheksidin telah mendapat persetujuan dari ADA (*American Dental Association*).

Penggunaan jangka panjang klorheksidin lebih dari 6 bulan pemakaian tanpa pengawasan dokter sebagai bahan obat kumur ini akan menimbulkan banyak efek samping, diantaranya terjadi perubahan rasa, pembentukan kalkulus supragingival, dan terjadinya deskuamasi mukosa oral (Saima dan Ahmad, 2019). Menurut Setiani *et al.* (2020), efek samping serius yang mungkin terjadi akibat takaran dosis dan frekuensi penggunaan klorheksidin berlebihan serta akibat pemberian obat kumur pada pasien dengan hipersensitifitas produk berbahan klorheksidin yaitu menyebabkan munculnya sariawan, pembengkakan di kelenjar saliva, sulit mengatur pernapasan, bahkan dapat menyebabkan pembengkakan pada seluruh wajah, area bibir, dan lidah, serta tenggorokan. Mengingat banyaknya efek samping yang ditimbulkan dari klorheksidin sebagai obat kumur,

maka diperlukan pemberian obat kumur berbahan alami yang memiliki efek samping yang lebih rendah dari klorheksidin.

Pemanfaatan herbal secara empiris saat ini menjadi fokus alternatif terbaru bertajuk “*Back to nature*” dalam pembuatan obat kumur dikarenakan memiliki kemampuan antibakteri yang efektif dengan efek samping lebih rendah dibanding dengan obat kumur dengan penambahan bahan kimia sintesis. Salah satu tanaman obat yang memiliki efek antibakteri adalah daun pegagan. Daun pegagan merupakan tanaman yang termasuk ke dalam salah satu komoditi besar dari 66 jenis tanaman obat yang dikelompokkan berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian Indonesia No. 511 Tahun 2006. Menurut keputusan tersebut dijelaskan bahwa tidak semua tanaman obat dibudidayakan secara berkelanjutan, tetapi banyak dipanen langsung secara bebas dari alam. Seperti halnya daun pegagan yang dapat dengan mudah ditemukan tumbuh bebas maupun dibudidayakan secara khusus untuk diambil manfaatnya (Salim dan Munadi, 2017).

Tanaman pegagan sangat banyak diminati di Asia Pasifik dalam jangkauan luas sebagai keperluan pengobatan, kosmetik, dan farmasi. Menurut Sutardi (2016), di Indonesia, persentase kebutuhan akan daun ini cukup tinggi mencapai 126 ton per tahun dan banyak dimanfaatkan sebagai sayuran maupun tanaman obat untuk menurunkan demam, antialergi, antioksidan, stimultan sistem saraf pusat (SSP), dan antibakteri (Idris dan Nadzir, 2021). Menurut penelitian Azzahra dan Hayati (2018), ekstrak daun pegagan memiliki kemampuan antibakteri terhadap *S. mutans*. Penelitian lain menurut Putri (2019), ekstrak daun pegagan terbukti memiliki kemampuan antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dengan cara menghambat pembentukan biofilm pada bakteri tersebut. Menurut Senthilkumar (2018), kemampuan antibakteri tersebut diduga karena kandungan senyawa metabolit sekunder pada daun pegagan seperti, flavonoid sebesar 25,98%, tannin (35,11%), steroid (22,15%), saponin (28,64%), alkaloid (58,63%), dan terpenoid (30,23%). Kandungan zat aktif utama yang menjadi biomarker adalah asiatikosida, centellosida, asam madeskasik, dan asam asiatica yang merupakan turunan terpenoid sebagai senyawa metabolit sekunder golongan

triterpenoid pentasiklik yang hanya terdapat pada daun pegagan (Sutardi, 2016; Susetyarini dan Nurrohman, 2022).

Penelitian Hayati *et al.* (2013) menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan terbukti dapat menghambat *S. aureus* pada konsentrasi 50% dan 75%, sedangkan konsentrasi 12,5% dan 25% diketahui tidak memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian aktivitas antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus* masih belum diketahui. Sehingga, penulis ingin melakukan penelitian dengan mengadaptasi konsentrasi yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri tersebut ke dalam penelitian ini. Hal ini diasumsikan bahwa *S. aureus* dan *L. acidophilus* memiliki persamaan yaitu keduanya tergolong ke dalam bakteri Gram positif anaerob fakultatif yang memiliki struktur morfologi jenis bakteri yang sama, sehingga diharapkan dapat memberikan efek antibakteri ekstrak daun pegagan serupa terhadap *L. acidophilus*. Selain itu, penulis ingin meneliti satu tingkat konsentrasi di atasnya, yaitu konsentrasi 100% untuk mengetahui konsentrasi yang dianggap setara dengan klorheksidin 0,2% sebagai kontrol positif. Penelitian ini diharapkan dapat menggali potensi ekstrak daun pegagan sebagai obat kumur yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri pengganti klorheksidin 0,2%.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian penjelasan pada latar belakang di atas, maka didapatkan rumusan masalah pada penelitian ini sebagai berikut:

1. Apakah terdapat efek antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap *L. acidophilus*?
2. Bagaimanakah efek antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) pada konsentrasi 50%, 75%, dan 100% terhadap *L. acidophilus*?
3. Bagaimana perbandingan kemampuan antibakteri konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) dengan klorheksidin 0,2% terhadap *L. acidophilus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hal-hal sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap *L. acidophilus*.
2. Menganalisis potensi kemampuan antibakteri seiring peningkatan konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) 50%, 75%, dan 100% terhadap *L. acidophilus*.
3. Mengetahui perbandingan kemampuan antibakteri konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) dengan klorheksidin 0,2% terhadap *L. acidophilus*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan ilmu, wawasan, dan informasi mengenai efek antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap *L. acidophilus*.
2. Dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya dalam pemanfaatan ekstrak daun pegagan dalam bidang kedokteran gigi, khususnya pencegahan karies gigi dan sebagai antibakteri penyakit pada jaringan keras gigi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karies Gigi

2.1.1 Definisi Karies Gigi

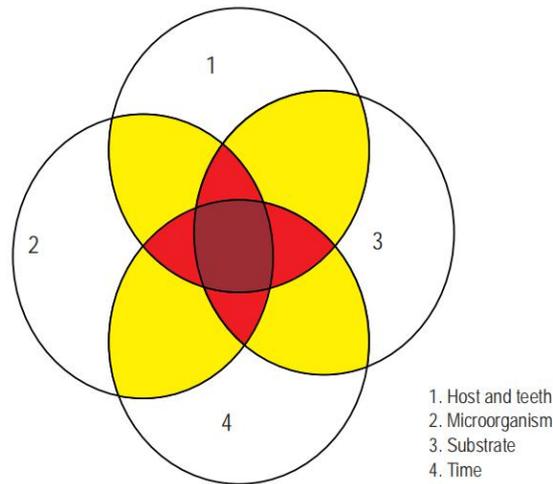
Karies gigi merupakan penyakit mikrobial *irreversible* pada jaringan keras gigi dengan ciri adanya demineralisasi dan kerusakan bahan organik yang diawali dengan munculnya bercak putih atau coklat yang dapat berkembang menjadi coklat kehitaman (Gambar 2.1). Kata karies berasal dari Bahasa Latin “*karies dentis*” yang bermakna “lubang gigi”. Kavitas mulai terbentuk saat mineral gigi mulai luluh karena aktivitas hasil reaksi fermentasi glukosa oleh bakteri penghasil asam (Kusumawardani dan Robin, 2019; Sivapathasundharam, 2020).



Gambar 2.1 Gambaran klinis karies gigi lanjutan berwarna coklat kehitaman (Sumber: Sivapathasundharam,2020)

2.1.2 Etiologi Karies Gigi

Karies gigi merupakan penyakit multifaktorial yang diantaranya disebabkan oleh inang (*host*) yang rentan, flora kariogenik dan substrat yang sesuai yang harus ada dalam waktu yang cukup. Karies gigi hanya akan dapat terjadi apabila keempat faktorial penyebab ini telah terpenuhi dan bekerja secara simultan satu dengan lain (Gambar 2.2) (Kusumawardani dan Robin, 2019; Sivapathasundharam, 2020).



Gambar 2.2 Etiologi karies gigi (Sumber: Sivapathasundharam, 2020)

a. Host dan Gigi

Faktor gigi atau inang yang rentan adalah salah satu etiologi penting dalam meningkatkan kejadian karies, beberapa diantaranya adalah struktur morfologi dan anatomi, komposisi gigi dan posisi gigi dalam lengkung rahang. Karakteristik morfologi gigi yang rentan terjadi karies adalah daerah *pit* dan *fissure* gigi yang dalam baik oklusal maupun bukal atau lingual *pit* yang biasanya terjadi pada molar pertama rahang bawah diikuti oleh molar pertama rahang atas, molar kedua rahang bawah serta molar kedua rahang atas. Bila ditemukan adanya daerah halus pada daerah proksimal dibawah titik kontak akan sering ditemukan sisa makanan yang terjebak (Sivapathasundharam, 2020).

Karakteristik lain yaitu bila terdapat daerah tepi tumpatan yang *overhanging* dan permukaan akar yang terbuka juga merupakan karakteristik gigi yang mudah untuk terjadi karies. Kondisi gigi demikian akan memudahkan bakteri penyebab karies untuk menempel. Posisi gigi juga menjadi faktor penting lain dalam etiologi karies gigi. Gigi yang *malaligned* atau tidak rata, gigi keluar posisi, dan gigi berotasi akan sulit dibersihkan dan cenderung menyebabkan penumpukan makanan sehingga akan dengan mudah terjadi karies (Sivapathasundharam, 2020).

Faktor host lain sebagai etiologi karies yaitu saliva, diantaranya pH, kapasitas *buffer*, dan jumlah saliva. Kondisi pH saliva berkaitan dengan keasaman lingkungan rongga mulut yang tersaturasi dengan kalsium dan fosfat sehingga

menyebabkan larutnya bahan anorganik gigi, hal ini biasa disebut dengan pH kritis yang berkisar pada pH 5,5. Kapasitas *buffer* saliva, terbukti mempengaruhi proses terjadinya karies gigi. Kandungan karbonat dalam saliva akan bekerja menyebar ke dalam plak gigi untuk menetralkan asam dari fermentasi karbohidrat oleh bakteri. Kemampuan saliva untuk kapasitas *buffer* ini dipengaruhi oleh jumlah saliva, sehingga apabila pada seseorang terdapat jumlah saliva yang sedikit (hiposalivasi) akan menurunkan kapasitas *buffer* saliva yang dapat melindungi gigi dari karies (Sivapathasundharam, 2020).

b. Mikroorganisme

Mikroorganisme atau *agent* merupakan salah satu faktor yang berperan penting dalam proses terjadinya karies gigi. Mikroorganisme ini berada di dalam matriks intraseluler pada plak yang melekat pada gigi. Bakteri penyebab utama karies gigi yaitu *S. mutans* serotipe C dan *L. acidophilus*. Kedua bakteri ini memiliki sifat asidogenik dan asidurik yang mampu membuat suasana asam dari fermentasi karbohidrat, glukosa maupun sukrosa. Keduanya mampu tumbuh subur dalam suasana pH rendah (asam) dan membuat polisakarida ekstrasel dari karbohidrat. Konsistensi polisakarida ini seperti gelatin yang lengket dari polimer glukosa yang menyebabkan terbentuknya matriks plak gigi sehingga bakteri mudah menempel satu sama lain dan menghambat saliva dalam fungsinya menetralkan plak (Listrianah, 2017; Listrianah *et al.*, 2018; Kusumawardani dan Robin, 2019).

c. Substrat

Substrat atau lingkungan yang dapat meningkatkan proses terjadinya karies gigi adalah adanya bahan makanan yang mengandung polisakarida, glukosa dan sukrosa. Sukrosa merupakan kandungan yang paling bersifat kariogenik dibanding jenis gula lainnya. Karena pada makanan tersebut akan difermentasi atau diubah oleh bakteri rongga mulut menjadi asam laktat melalui proses glikolisis. Terbentuknya asam laktat ini akan menimbulkan penurunan pH gigi dan memicu demineralisasi bahan anorganik yang terkandung pada email gigi (Listrianah, 2017; Listrianah *et al.*, 2018; Kusumawardani dan Robin, 2019).

d. Waktu

Waktu menjadi salah satu faktor yang berperan penting dalam proses karies. Bahan makanan karbohidrat apabila tidak segera dibersihkan akan menarik bakteri untuk difermentasikan. Fermentasi bakteri ini dapat menurunkan pH rongga mulut dan menyebabkan demineralisasi gigi. Demineralisasi gigi terjadi setelah 2 jam, akan segera terjadi remineralisasi apabila viskositas saliva terjaga dengan baik dan plak segera dibersihkan. Penyebab lainnya dari faktor waktu adalah frekuensi *host* gigi dan saliva dalam terpapar bahan makanan kariogenik sehingga gigi menjadi rentan karies (Listriana, 2017; Kusumawardani dan Robin, 2019).

e. Faktor Lain

Faktor lain penyebab karies gigi antara lain seperti ras, jenis kelamin, kehamilan, usia, faktor sosial ekonomi, dan keterkaitan dengan penyakit sistemik. Pengaruh ras dalam penyebab karies biasanya berkaitan dengan keadaan tulang rahang yang sempit dari suatu ras sehingga menyebabkan gigi geligi tampak berdesakan dan tidak teratur. Sehingga hal ini menyebabkan kesulitan dalam pembersihan dan pengaturan *oral hygiene* yang dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya karies. Pengaruh jenis kelamin menurut pengamatan Milhahn-Turkeheim bahwa gigi M1 wanita memiliki potensi terjadi karies lebih tinggi dibanding pria berkaitan dengan pembentukan amelogenin terkait dengan kromosom Y pada pria yang lebih tinggi sehingga memiliki struktur gigi yang lebih kuat dan lebih tahan terhadap karies (Listriana *et al.*, 2018).

Proses kehamilan juga mempengaruhi peningkatan kemungkinan terjadinya karies yang berkaitan dengan hormon estrogen wanita yang meningkat, penurunan sistem imun, dan beberapa perubahan fisik yang terjadi di kala proses tersebut berlangsung. Hal ini berefek negatif pada kondisi rongga mulut seperti penurunan laju saliva dan terganggunya *buffer* pH sehingga menyebabkan banyak ibu hamil rentan mengalami karies. Faktor usia juga menjadi salah satu penyebab terjadinya karies. Anak-anak usia 6-12 tahun periode gigi campuran merupakan usia paling banyak menunjukkan kejadian karies. Hal ini berkaitan dengan pertumbuhan anak yang terjadi dimana anak-anak suka bermain dan

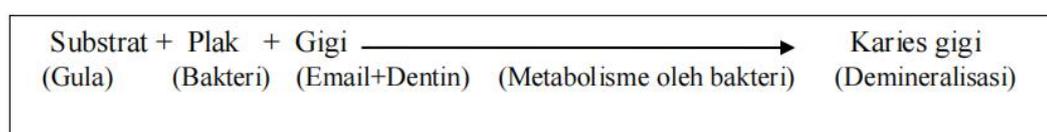
makan minum yang manis serta masih banyak yang belum bisa menjaga kebersihan rongga mulut (Ferraro dan Vieira, 2010; Listrianah *et al.*, 2018).

Faktor sosial ekonomi secara tidak langsung juga menyebabkan terjadinya karies, hal ini berkaitan dengan banyaknya masyarakat yang masih belum bisa mengakses kesehatan terutama di bidang gigi dan mulut karena alasan terbatasnya ekonomi, kurangnya pengetahuan dan kemampuan dalam menangani masalah kesehatan gigi dan mulut yang terjadi. Faktor terakhir yaitu faktor keterkaitan karies dengan penyakit sistemik berupa asma dan epilepsi (Ferraro dan Vieira, 2010).

2.1.3 Patogenesis Karies Gigi

Karies gigi dimulai apabila terbentuk plak yang menempel kuat pada permukaan gigi sebagai tempat tinggal bakteri penyebab karies gigi. Bakteri utama yang berperan dalam proses karies yaitu *S. mutans* dan *L. acidophilus*. Plak gigi yang tidak segera dibersihkan akan menumpuk, dan semakin sulit untuk dibersihkan. Hal ini diperparah oleh kebersihan rongga mulut yang buruk, seperti setelah mengonsumsi makanan jenis karbohidrat tertentu tidak segera dibersihkan dan dibiarkan menumpuk di sela-sela gigi. Hal ini akan menarik mikroorganisme dalam rongga mulut untuk memfermentasikan sisa makanan tersebut melalui proses glikolisis menjadi asam piruvat dan asam laktat (Listrianah, 2017; Kusumawardani dan Robin, 2019).

Fermentasi yang terjadi akan menurunkan pH rongga mulut hingga dibawah 5 hanya dalam waktu 1-3 menit dan untuk kembali ke pH awal membutuhkan waktu 30-60 menit. Frekuensi penurunan pH yang terus menerus terjadi akan mempercepat proses demineralisasi email gigi, yaitu terjadinya kelarutan kalsium pada email gigi sehingga email menjadi rusak dan terjadi karies (Gambar 2.3) (Listrianah, 2017; Kusumawardani dan Robin, 2019).



Gambar 2.3 Mekanisme karies gigi (Sumber: Ratih dan Dewi, 2019)

Normalnya saat terjadi demineralisasi akan terjadi proses remineralisasi, yaitu tersedianya Ca^{2+} dan PO_4^{3-} yang cukup pada rongga mulut dan pH kembali normal. Kembalinya pH dan kecukupan kalsium dan fosfat ini dibantu oleh kapasitas *buffer* dan viskositas saliva, serta *fluoride* yang bisa didapatkan dengan cara topikal maupun sistemik. Ikatan *fluoride* dengan hidroksiapatit lebih besar dari OH^- . *Fluoride* ini juga dapat untuk menurunkan pH kritis menjadi 4,5, sehingga apabila pH turun dibawah 4,5 akan baru memulai proses demineralisasi gigi (Listriana, 2017; Kusumawardani dan Robin, 2019).

Saat terjadi karies gigi, proses demineralisasi lebih dominan dibandingkan proses remineralisasinya. Hal ini disebabkan oleh karena saat waktu menuju remineralisasi dengan waktu 30-60 menit, biasanya kondisi rongga mulut terus mengalami penurunan pH karena fermentasi karbohidrat oleh bakteri dari sisa makanan yang tidak dibersihkan sehingga proses remineralisasinya menjadi lebih lambat dari biasanya. Proses ini terjadi saat ion asam bereaksi dengan fosfat dalam saliva dan plak sehingga sampai pada pH kritis dibawah 5,5 (Listriana, 2017; Kusumawardani dan Robin, 2019).

2.2 *Lactobacillus acidophilus*

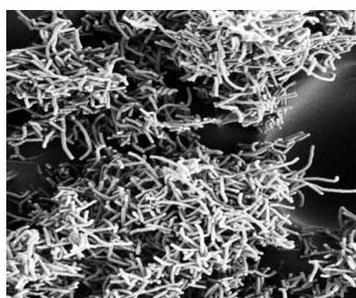
2.2.1 Taksonomi

Klasifikasi organisme dari *L. acidophilus* dalam Samaranayake (2018) adalah sebagai berikut :

Domain	: <i>Bacteria</i>
Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Lactobacillales</i>
Famili	: <i>Lactobacillaceae</i>
Genus	: <i>Lactobacillus</i>
Spesies	: <i>Lactobacillus acidophilus</i>

2.2.2 Karakteristik dan Morfologi

Lactobacillus sp. merupakan salah satu jenis bakteri dominan rongga mulut penyebab keparahan karies gigi. *L. acidophilus* merupakan bakteri Gram positif, anaerob fakultatif, berukuran kurang lebih 0,6–0,9 x 1,5–6 μm , berbentuk *coccobacillary forms* namun paling sering ditemukan dalam bentuk basil dengan ujungnya membulat, berpasangan dalam rantai pendek, *non-motil*, *non-spora* (Gambar 2.4), dan menghasilkan produk asam laktat dan asam asetat sebagai hasil metabolisme dan fermentasi (Anjum *et al.*, 2014; Nurhalisa *et al.*, 2020).



Gambar 2.4 *Scanning Electron Micrograph* dengan Perbesaran 10.000x pada *L. acidophilus* (Sumber: Pyar dan K.K. Peh, 2014)

L. acidophilus memiliki 2 sifat utama yaitu asidogenik dan asidurik. Asidogenik yaitu merupakan proses dari bakteri ini dalam memfermentasikan karbohidrat untuk membentuk asam, sedangkan asidurik adalah kemampuan bakteri dalam bertahan hidup dari *acidic milieu* atau pada suasana asam. *Lactobacilli* tumbuh dalam kondisi mikroaerofilik dengan kebutuhan adanya karbon dioksida (CO_2) dan pada pH 6 yang tergolong pH asam (Samaranayake, 2018).

Uji identifikasi dilakukan dengan uji pewarnaan Gram pada *L. acidophilus* yang telah ditetaskan pewarna kristal violet dan diidentifikasi dengan mikroskop akan menghasilkan warna ungu, sehingga hal ini membuktikan bahwa bakteri ini termasuk Gram positif. Hal ini berkaitan dengan struktur morfologi bakteri *L. acidophilus* yang memiliki dinding sel lebih sederhana dengan kandungan peptidoglikan lebih banyak dibandingkan dengan bakteri Gram negatif (Wardinal *et al.*, 2019).

Bakteri ini tidak ditemukan pada bayi baru lahir, namun 50% mulai ada di kehidupan pertama seorang anak mulai usia 1-2 tahun, dan hadir dalam jumlah

spesimen tertinggi di saliva, dorsum lidah, palatum durum, plak gigi, dan pada permukaan gigi. Keberadaan *L. acidophilus* pada anak usia 6-16 tahun ditemukan semakin meningkat. Hal ini berkaitan dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa hal ini berkaitan dengan *intake* dan konsumsi karbohidrat dari anak semasa kecil hingga remaja (Badet dan Thebaud, 2008).

Penelitian sebelumnya menyebutkan kandungan bakteri ini bisa ditemukan pada anak-anak memiliki presentasi lebih tinggi dibandingkan dengan dewasa. Keberadaan bakteri ini pada dewasa lebih dipengaruhi oleh keadaan ekologi rongga mulut yaitu kebiasaan merokok, pengguna *prothesa*, dan kondisi kebersihan rongga mulut. Prosentase jumlah bakteri ini pada rongga mulut adalah kurang dari 1% dari seluruh total flora tersebut dalam tubuh. Selain ditemukan pada rongga mulut, bakteri ini dominan ditemukan pada saluran pencernaan dan organewanitaan. (Badet dan Thebaud, 2008; Ahirwar *et al.*, 2017; Samaranayake, 2018).

Bakteri *L. acidophilus* merupakan bakteri yang mampu untuk hidup dengan pengaruh kondisi lingkungan sekitar. Berdasarkan penelitian Utami (2013), menunjukkan bahwa *L. acidophilus* mampu untuk tumbuh (viabilitas) dengan sangat optimal dan ideal pada suhu 4°C selama 4 minggu, dan menunjukkan stabilitas yang cukup baik pada penyimpanan pada suhu kamar atau ruangan yaitu sebesar 25°C selama 4 minggu, namun menunjukkan penurunan kemampuan tumbuh pada suhu 44°C selama 4 minggu. Penurunan kemampuan tumbuh yang terjadi akibat penyimpanan pada suhu yang tinggi tanpa melalui suhu ruang dapat mempengaruhi struktur sel. Sehingga apabila bakteri disimpan dalam kondisi kering dan sering berada pada suhu ruang, bakteri masih memiliki viabilitas dan stabilitas yang baik, namun perlu segera dilakukan preservasi dan rekultur untuk mempertahankan kemampuan tumbuh dan keberlangsungan hidup bakteri. Pemeliharaan bakteri (preservasi) bertujuan untuk mempertahankan daya tumbuh (viabilitas) bakteri dan menjaga (*recovery*) isolat agar daya tumbuh dan kelangsungan hidupnya tidak mengalami perubahan yang signifikan yang dapat mempengaruhi sifat morfologi bakteri tersebut (Raisyah dan Fairani, 2021).

2.2.3 Mekanisme *L. acidophilus* Penyebab Karies Gigi

L. acidophilus merupakan bakteri yang dapat menghasilkan matriks EPS yang merupakan material penting dalam pembentukan plak (Karpinska dan Szakaradkiewicz, 2021). Sehingga bakteri ini juga sering ditemukan berada pada plak gigi dan secara signifikan memainkan peran dalam perkembangan karies gigi. Hal ini disebabkan karena *L. acidophilus* dapat bertahan pada lingkungan pH yang rendah. Bakteri ini termasuk ke dalam golongan metabolisme homofermenter yang menandakan bahwa bakteri ini dapat memfermentasi asam laktat dengan baik, sehingga berdampak pada penurunan pH rongga mulut menjadi dibawah 4,5. Bahkan pada penelitian sebelumnya mengatakan bahwa bakteri ini sanggup bertahan pada pH 2,2 (Ahirwar *et al.*, 2019).

Mekanisme karies gigi lanjutan perlu adanya kerjasama antara *S. mutans* sebagai faktor utama inisiator formasi dental karies dan *Lactobacillus sp.* yang akan memainkan peran penting untuk memperparah formasi karies. Dalam kondisi lingkungan rongga mulut rentan karies seperti kaya akan gula sukrosa maupun karbohidrat, pH rendah dibawah 5, laju saliva rendah, sifat permukaan gigi, dan populasi bakteri yang meningkat inilah yang akan membentuk dental biofilm (spesifik plak) penyebab karies lanjut (Pitts *et al.*, 2017; Ahirwar *et al.*, 2019).

Spesies *L. acidophilus* memiliki sifat kariogenik seperti produksi asam laktat, mempengaruhi hidrofobisitas permukaan sel, produksi EPS, dan protein *S-Layer*. Produksi asam laktat yang dilakukan oleh bakteri ini disebabkan oleh fermentasi gula hingga terjadi perubahan pH lingkungan rongga mulut menjadi asam, pH dibawah 4,5. Kolonisasi bakteri menempel pada plak gigi yang menyertai karies lanjut akan memudahkan proses demineralisasi permukaan enamel gigi. Kemudian perlekatan *Lactobacillus* terhadap permukaan gigi yaitu dengan formasi dental biofilm dengan hidrofobisitas permukaan sel yang sangat memodulasi sifat keterikatan bakteri asam laktat. Interaksi non kovalen jarak jauh terkuat adalah interaksi hidrofobik yang merupakan faktor penentu utama dalam adhesi mikroba pada permukaan (Ahirwar *et al.*, 2019).

EPS secara ekstensif diproduksi oleh spesies *Lactobacillus* sebagai salah satu faktor pembentukan dental biofilm yang berantai panjang, biopolimer linier maupun bercabang. Berat molekul biopolimer tinggi yang terdiri dari pengulangan unit sakarida dan dihubungkan oleh α - dan β - ikatan glikosida dan bersifat lengket dan berperan penting dalam adhesi dental biofilm. Yang terakhir adalah protein *S-Layer* yang merupakan komponen struktural lapisan luar dinding sel bakteri dari berbagai jenis protein zat. Adaptasi mikroorganisme terhadap lingkungan yang merugikan terjadi dari beragam struktur lapisan batas terluar bakteri yang merupakan fungsi biologis protein *S-Layer*. Protein *S-Layer* milik *Lactobacillus* berperan penting dalam adhesi sel ke sel inang, sehingga bakteri ini dapat menyesuaikan hidrofobisitas permukaannya dalam perubahan lingkungan karena memiliki protein *S-Layer* di dinding sel luarnya (Ahirwar *et al.*, 2019).

2.3 Daun Pegagan

2.3.1 Taksonomi

Tanaman pegagan (*C. asiatica*) merupakan tanaman yang berasal dari daerah tropis yang termasuk ke dalam 50 jenis tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat utama di Indonesia. Tanaman pegagan memiliki banyak nama lain di daerah lain di Indonesia diantaranya antanan (Jawa Barat), kaki kuda (Sumatera), tikusan (Madura), taiduh (Bali), di Halmahera masyarakat menyebutnya kori-kori, di Minangkabau disebut pegago, serta di Lombok disebut bebile. Sebutan lain tanaman pegagan dari beberapa negara antara lain Gotu Kola (Sinhala, Sri Lanka), *Indian pennywort* (Inggris, Amerika), *Ji xue cao* (Tiongkok), dan *bevilaque*, *hydrocote d'Asie*, atau *cotyiole asiatique* (Prancis) serta masih banyak lainnya. (Sutardi, 2016; Azzahra dan Hayati, 2018; Susetyarini *et al.*, 2020).

Klasifikasi taksonomi tanaman pegagan adalah sebagai berikut dalam (Sutardi, 2016) yaitu sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>

Ordo : *Umbellales*
 Famili : *Umbelliferae (Apiaceae)*
 Genus : *Centella*
 Spesies : *Centella asiatica (L.) Urban*

2.3.2 Morfologi

Tanaman pegagan memiliki berbagai keragaman morfologi dan karakteristik berdasarkan lokasi asalnya. Perbedaan karakteristik ini dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya, genetik, nutrisi dan mineral, jenis tanah, kondisi lingkungan, aksesori dari berbagai lokasi, dan kebutuhan akan cahaya matahari (Gambar 2.5) (Sutardi, 2016; Chandrasekara *et al.*, 2020).



Gambar 2.5 Tanaman pegagan (Sumber: Sutardi, 2016; Susetyarini *et al.*, 2020)

Tanaman pegagan memiliki bagian-bagian diantaranya:

a. Daun Pegagan

Tanaman pegagan memiliki daun tunggal, tersusun dalam roset akar yang terdapat 2 hingga 10 daun. Mayoritas daun pegagan berwarna hijau tua, namun pada beberapa kesempatan ditemukan daun pegagan usia tua berwarna hijau kekuningan. Daun pegagan berbentuk ginjal dengan pangkal daun (*basis folii*) tumpul dan ujung daun (*apex folii*) membulat, tepi bergerigi, susunan tulang daun menjari, helaian daun berbentuk oval, dan daging daun kaku (*perkamenteus*) (Gambar 2.6). Ukuran daun pegagan bervariasi, lebar dengan garis tengah daun terhitung kurang lebih 1-7 cm tergantung dari tempat hidup tanaman tersebut. Sisi bawah daun pegagan sering ditemukan sedikit helai rambut halus berwarna putih yang biasa disebut trikoma daun, sedangkan sisi permukaan atas daun halus. Daun

pegagan memiliki bau yang tidak terlalu tajam serta stolon berwarna coklat gelap (Gambar 2.8) (Maruzy *et al.*, 2020; Susetyarini *et al.*, 2020; Tirta dan Putra, 2020).

Tanaman pegagan (*C. asiatica*) dalam penelitian ini diambil bagian daunnya saja, tidak termasuk batang, akar, bunga, dan buahnya. Hal ini disebabkan oleh karena secara fitokimia, daun pegagan merupakan bagian akumulator tertinggi dari komponen bioaktif yang secara umum digunakan untuk keperluan terapeutik. Berdasarkan penelitian Vaddadi *et al.* (2017) ekstrak etanol daun pegagan menunjukkan efek maksimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri oleh karena tingginya kandungan bioaktif didalamnya dibanding bagian tanaman lainnya. Pengambilan daun pegagan dalam penelitian dilakukan di sore hari setelah melalui proses fotosintesis dengan intensitas cahaya maksimal. Intensitas cahaya pada sore hari merupakan intensitas cahaya optimum dengan harapan telah mendapatkan kandungan zat aktif yang optimum didalamnya, dikarenakan daun pegagan merupakan tanaman yang sensitif terhadap intensitas cahaya (Martono, 2011).

Wilayah Jember merupakan wilayah dengan ketinggian 0-3300 m di atas permukaan laut. Daun dari tanaman yang hidup di wilayah *highland* (>500 mdpl), *midland* (250-500 mdpl) dan *lowerland* (0-250 mdpl) akan menunjukkan bentuk daun seperti ginjal (*kidney-like*) dengan tepi daun yang tidak halus dan satu daun berada pada satu *petiole*. Secara agronomis, ukuran daun, jumlah daun, panjang stolon, jumlah *rosset*, panjang rhizoma, dan jumlah bunga sangatlah bergantung terhadap lokasi dimana daun tersebut tumbuh. Kondisi tanpa pencahayaan adalah kondisi optimum untuk pertumbuhan pegagan (Kurniawati *et al.*, 2005). Rata rata lebar dan panjang dengan garis tengah daun pegagan ini rata rata 3-5 cm. Pada Penelitian Ramandey dan Bunei (2021) menunjukkan bahwa tanaman pegagan yang tumbuh dilokasi tanpa sinar matahari langsung memiliki daun yang lebih lebar dan lebih tebal dibandingkan dengan yang mendapat sinar matahari langsung. Hal ini akan berkaitan dengan kemampuan adaptasi supaya daun tersebut memiliki luas daun yang cukup pada intensitas cahaya rendah dalam menangkap cahaya matahari (Musyarofah *et al.*, 2007).



Gambar 2.6 Morfologi daun pegagan (Sumber: Susetyarini *et al.*, 2020)

b. Tangkai Pegagan (*petiole*)

Tangkai pegagan (*petiole*) memiliki tekstur lunak, berair, tidak berkayu, berwarna merah pada pangkal tangkai, namun berwarna hijau pada sisi ujung mendekati daun, terdapat bagian menjorok pada permukaan *petiole* namun tidak terlalu tampak, tangkai pegagan bisa memiliki panjang mencapai kurang lebih 5-7 cm (Gambar 2.7) (Hamid, 2015; Susetyarini *et al.*, 2020).



Gambar 2.7 Tangkai pegagan (*petiole*) (Sumber: Susetyarini *et al.*, 2020)

c. Stolon

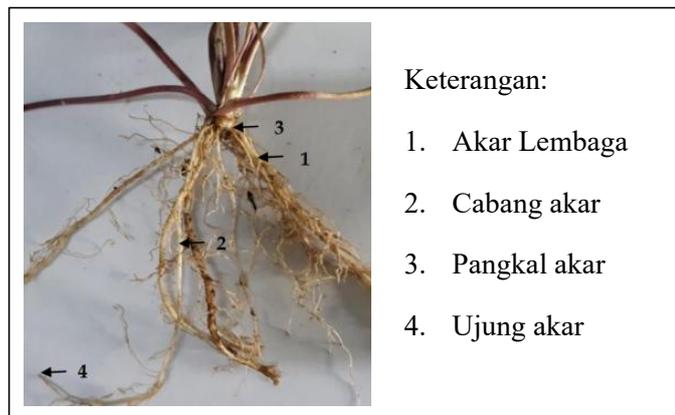
Stolon pegagan memiliki warna coklat kegelapan, tekstur berair, lunak, dan tidak berkayu. Stolon pegagan ini mampu tumbuh sepanjang 10-80 mm (Gambar 2.8) (Maruzy *et al.*, 2020; Susetyarini *et al.*, 2020).



Gambar 2.8 Bagian yang ditunjuk panah hitam merupakan stolon pegagan (Sumber: Susetyarini *et al.*, 2020)

d. Akar Pegagan

Tanaman pegagan memiliki akar tunggang, dengan akar lembaga yang ditumbuhi cabang serabut akar yang lebih kecil (Gambar 2.9). Tanaman pegagan ini memunculkan akar pada setiap bonggol tanamannya (Susetyarini *et al.*, 2020).



Gambar 2.9 Morfologi akar pegagan (Sumber: Susetyarini *et al.*, 2020)

e. Bunga dan Buah

Bunga tanaman pegagan ini berbentuk karangan bunga payung (*umble*) atau merupakan struktur perbungaan tangkai bunga dengan panjang yang sama menyebar dalam satu pusat yang sama (Gambar 2.10). Bunga pegagan ini terdiri 3-5 bunga tunggal berwarna putih keunguan dan merah muda. Tangkai bunga memiliki panjang 5-50 mm. Bunga pegagan ini biasanya akan mekar pada sekitar bulan April hingga Juni. Tanaman pegagan juga memiliki buah berbentuk oval atau bulat, tebal, dengan panjang kurang lebih 2 inchi (Susetyarini *et al.*, 2020; Tirta dan Putra, 2020).



Gambar 2.10 Morfologi pegagan . 1) Tangkai Bunga, 2) Kelopak Bunga, dan 3) Mahkota Bunga (Sumber: Susetyarini *et al.*, 2020)

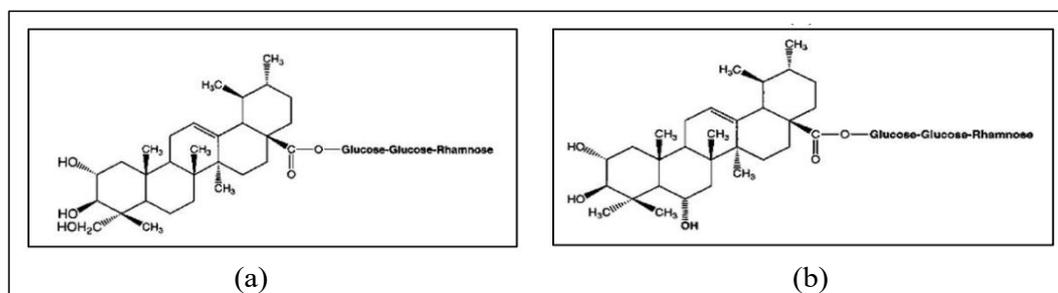
2.3.3 Habitat

Daun pegagan merupakan tanaman yang berdistribusi di wilayah tropis dan subtropis. Daun pegagan berasal dari Asia Tenggara, Afrika Selatan, India dan Sri Lanka, beberapa bagian di China, Madagaskar, *United States* bagian tenggara, Mexico, Venezuela, Colombia, dan *South America* bagian timur. Penyebaran daun pegagan cukup luas, bisa hidup pada dataran tinggi maupun dataran rendah. Pegagan banyak ditemukan di pematang sawah, kebun, ladang, tepi-tepi jalan, ataupun pada ladang dengan tanah yang sedikit basah. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman pegagan memiliki daya adaptasi yang sangat bagus (Sutardi, 2016; Susetyarini *et al.*, 2020; Tirta dan Putra, 2020).

Tanaman pegagan dapat tumbuh pada tanah sedikit lembap dengan sinar matahari cukup dan sedikit terlindung, hal inilah yang akan mempengaruhi terbentuknya perbedaan morfologi bentuk daun dan kandungan senyawa bioaktif dari daun pegagan. Pegagan akan tumbuh dengan baik pada kondisi lingkungan dengan intensitas cahaya rendah, hampir serupa *shade plant* dengan titik jenuh sebesar 1-5 mol m²/detik, serta memiliki laju respirasi rendah. Laju respirasi rendah menandakan bahwa tanaman *shade plant* akan beradaptasi dan mampu bertahan pada daerah dengan cahaya terbatas di dataran tinggi dengan iklim basah dan intensitas cahaya rendah. Tanaman ini juga dapat tumbuh optimum pada ketinggian 700 mdpl hingga pada ketinggian 2500 mdpl dari permukaan laut (Sutardi, 2016).

2.3.4 Kandungan dan Manfaat

Daun pegagan dikenal banyak memiliki manfaat di bidang kesehatan, sehingga banyak dimanfaatkan sebagai obat herbal. Senyawa kimia aktif daun pegagan salah satunya triterpenoid pentasiklik seperti diantaranya asam *asiatica*, asam *madescassic*, *asiaticoside*, dan *madecassoside*. Asiatikosida berperan dalam sistem imun, membantu stimulasi sel darah serta sebagai antibiotik alami. Jumlah kandungan didalamnya bervariasi tergantung kondisi dan lokasi asal pertumbuhannya (Sutardi, 2016; Tirta dan Putra, 2020). Struktur kimia triterpenoid pentasiklik pada daun pegagan dapat dilihat pada gambar berikut (Gambar 2.11):



Gambar 2.11 Struktur kimia *Centella asiatica*. (a) *Asiaticoside* dan asam *asiatica* (tanpa Glukosa Rhamnose); (b) *Madecassoside* dan asam *madecassic* (tanpa Glukosa Rhamnose) (Sumber:Tirta dan Putra, 2020)

C. asiatica juga kaya akan vitamin C, vitamin B1, vitamin B2, niasin, karoten dan vitamin A. Total abu kandungan pegagan mengandung klorida, sulfat, fosfat, besi, kalsium, magnesium, natrium dan kalium (Tirta dan Putra, 2020). Dalam 100 gr daun pegagan mengandung banyak nutrisi dan komponen-komponen kimia yang berperan dalam memberikan efek terapeutik bagi kesehatan. Beberapa diantaranya tertera dalam Tabel 2.1 berikut:

Tabel 2. 1 Komponen kimia daun pegagan

Variabel (per 100 gram)	Unit	Jumlah
Kalori	kal	34
Air	G	8,3
Protein	G	1,6
Lemak	G	0,6
Karbohidrat	G	6,9
Serat	G	2,0
Abu	G	1,6

Mineral		
Kalsium	Mg	170
Phosphor	Mg	30
Zat besi	Mg	3,1
Kalium	Mg	414
Vitamin		
Betakaroten	µg	6580
Tiamin	Mg	0,15
Riboflavin	Mg	0,14
Niasin	Mg	1,2
Askorbat	Mg	4,0

Sumber: Bermawie *et al.*, 2008

Menurut Sutardi (2016) *C. asiatica* mengandung bahan aktif seperti triterpenoid saponin, triterpenoid genin, minyak atsiri, flavonoid, fitosterol, dan bahan aktif lainnya. Komponen bahan aktif dalam senyawa metabolit sekunder terpenting daun pegagan adalah triterpenoid dan saponin (asiatikosida, sentelosida, madekosida, asam asiatik, minyak volatil, karbohidrat, asam amino, flavonoid, tannin dan fitosferol). Menurut Senthilkumar (2018) komponen bioaktif dalam ekstrak etanol daun pegagan memiliki kandungan sebesar alkaloid (58,63%), steroid (22,15%), flavonoid (25,98%), tannin (35,11%), terpenoid (30,23), saponin (28,64%), dan fenol (36,54%).

Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri dibagi menjadi 3 bagian yaitu dengan dengan menghentikan sintesis DNA dan RNA sehingga dapat menghambat terbentuknya asam nukleat bakteri (Ulanowska *et al.*, 2006), menghambat fungsi membran sel bakteri dengan melepaskan kalium pada dinding sel, sehingga menyebabkan kerusakan langsung pada dinding sel bakteri (Cushnie dan Lamb, 2005), serta menghambat metabolisme energi bakteri dengan cara mengubah membran luar dan sitoplasma sel, sehingga mengganggu pertukaran nutrisi dan metabolit sel dan akhirnya menghambat pasokan energi untuk kehidupan bakteri (Eumkeb dan Chunkrathok, 2013). Kandungan bahan aktif turunan flavonoid dalam daun pegagan antara lain berasal dari golongan kaempferol, kuersetin, glikosida (3-glukosilkuersetin dan 3-glukosilkaemferol) flavonoid O-glikosida dan C-glikosida (Susetyarini dan Nurrohman, 2022).

Mekanisme tannin sebagai antibakteri adalah dengan berikatan dengan peptidoglikan dinding sel dan mengganggu integritas sel untuk fungsi antibakteri sehingga dapat menghambat formasi atau pembentukan biofilm pada bakteri (Dong *et al.*, 2018). Kandungan bahan aktif turunan tannin dalam daun pegagan yaitu tannin terhidrolisis yang tersusun atas polimer gallic dan asam ellagic melalui ikatan ester dengan molekul gula, serta tannin terkondensasi yang tersusun atas polimer flavonoid dengan ikatan karbon-karbon berupa catechin dan gallo catechin yang mempunyai ikatan kompleks lebih kuat dibanding tannin terhidrolisis (Susetyarini dan Nurrohman, 2022).

Mekanisme saponin sebagai antibakteri adalah mendenaturasi protein membran sel bakteri hingga lisis, menghancurkan permeabilitas dinding sel bakteri, serta memodifikasi lipid membran sel sehingga bakteri sulit berinteraksi sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk mematikan bakteri (Johnson, 2013). Kandungan bahan aktif turunan saponin dalam daun pegagan yaitu brahmosida, brahminosida, madecassoside (Susetyarini dan Nurrohman, 2022). Mekanisme steroid sebagai antibakteri adalah dengan mengakibatkan kebocoran lisosom serta berinteraksi dengan fosfolipid sehingga integritas membran bakteri turun dan sel bakteri menjadi rapuh (Epanand *et al.*, 2007). Kandungan bahan aktif turunan steroid dalam daun pegagan yaitu tetrasiklik terpenoid, kampesterol, sitosterol, stigmasterol (Susetyarini dan Nurrohman, 2022).

Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah dengan bereaksi bersama protein transmembran pada dinding sel bakteri, kemudian membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga dapat mendenaturasikan porin di membran tempat keluar masuknya senyawa sehingga permeabilitas sel turun dan bakteri kekurangan asupan nutrisi dan bakteri menjadi mati (Cowan, 1999). Kandungan bahan aktif turunan terpenoid dalam daun pegagan yang merupakan kandungan utama terbesar yang berperan dalam daun pegagan adalah triterpenoid pentasiklik yaitu asiatikosida, asam asiatika, madekasik, centellosida (Sutardi, 2016). Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah berikatan dengan membran fosfolipid dan kelompok fosfat (komponen asam nukleat) sehingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler bakteri. Hal tersebut dapat menurunkan

integritas struktur membran sel yang dapat memicu kematian bakteri (Li *et al.*, 2014). Kandungan bahan aktif turunan alkaloid dalam daun pegagan yaitu piridin, tropen, kinolin, isokinolin, indol, imidazol, purin, dan amin (Susetyarini dan Nurrohman, 2022).

Daun pegagan memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan, beberapa diantaranya sebagai antibakteri, antiinflamasi, antialergi, antioksidan, dan antifungi. Daun pegagan dapat digunakan sebagai obat herbal yang meningkatkan sistem imun, menurunkan tekanan darah, antikeloid, antilupa dan antilepra, mencegah depresi, meningkatkan daya ingat dan konsentrasi, menghentikan produksi jaringan bekas luka yang berlebihan, mengobati luka, memperbaiki sel kulit mati, dan menghilangkan rasa nyeri persendian (Sutardi, 2016; Tirta dan Putra, 2020).

Beberapa khasiat lain dari tanaman pegagan adalah sebagai obat untuk menstimulasi syaraf, mengatasi demam, penyakit *bronkhitis*, kencing manis (*diabetes melitus*), dan psikoneurosis. Efek antiinflamasi pada daun pegagan pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa kandungan asam asiatika didalamnya dapat mereduksi edema kaki pada tikus yang telah ditingkatkan regulasi aktivitas katalasenya. Efek antioksidan daun pegagan ditemukan secara signifikan dipengaruhi oleh senyawa polifenol, flavonoid, β - karoten, tannin, vitamin C (Sutardi, 2016; Tirta dan Putra, 2020).

2.4 Klorheksidin (CHX)

Klorheksidin glukonat (*1,1'-hexamethylene bi [5-(p-chlorophenyl) biguanide] di-D-gluconate*) adalah garam glukonat, sebuah senyawa biguanida yang sudah ada sejak tahun 1950 yang dikenal luas sebagai agen antimikroba spektrum luas yang dapat menyebabkan gangguan pada membran sel bakteri. Klorheksidin digunakan secara luas dalam bidang kedokteran gigi dan penggunaan secara umum, diantaranya manajemen kebersihan mulut, penurunan plak gigi, membantu penatalaksanaan penyakit periodontal, serta sebagai larutan irigasi selama perawatan saluran akar. Klorheksidin juga digunakan dalam manajemen bedah mulut dan komplikasi terkait meliputi kondisi *dry socket*,

manajemen sebelum dan sesudah ekstraksi gigi, serta manajemen bedah lainnya (Brookes *et al.*, 2020).

Salah satu aplikasi penggunaan klorheksidin yaitu sebagai obat kumur antiseptik yang disarankan dokter gigi kepada masyarakat untuk mencegah terbentuknya biofilm bakteri dan akumulasi plak penyebab karies gigi. Konsentrasi umum klorheksidin sebagai obat kumur adalah 0,2% yang direkomendasikan untuk kontrol plak secara intensif dengan penggunaan 2 kali sehari, sebanyak 10 ml tiap kumur, dan dilakukan selama 30 detik, serta dalam pengawasan *dental professional*. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa klorheksidin 0,2% merupakan bahan paling potensial dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* penyebab karies gigi. Hal ini disebabkan oleh karena klorheksidin memiliki kemampuan antibakterial yaitu bakterisidal dan bakteristatik pada bakteri meliputi bakteri Gram positif maupun Gram negatif, fungi, maupun virus lain penyebab penyakit mulut (Brookes *et al.*, 2020).

Klorheksidin memiliki muatan positif (kation), sedangkan mayoritas bakteri bermuatan negatif (anion). Hal ini yang menyebabkan klorheksidin dapat melekat kuat pada membran sel bakteri. Perlekatan ini akan menyebabkan terbukanya permeabilitas membran sel bakteri sehingga sitoplasma sel dan komponen-komponen kecil didalamnya akan keluar melewati membran sel sehingga menyebabkan kematian pada bakteri (Brookes *et al.*, 2020).

Namun seiring perkembangan, penggunaan klinis klorheksidin baik dalam bentuk gel topikal maupun obat kumur dalam jangka waktu lama memunculkan efek samping. Efek samping tersebut diantaranya *staining* atau perubahan warna gigi menjadi kuning kecoklatan, mulut menjadi kering (*xerostomia*), muncul sensasi perubahan rasa (*hypogeusia*) terutama pada rasa asin dan asam, dan *coated tongue*. Efek samping lainnya meliputi munculnya sensasi terbakar (*glossodynia*), terjadi deskuamasi mukosa mulut, pembengkakan kelenjar parotid, dan paresthesia oral. Efek samping paling serius yang mungkin dapat terjadi adalah munculnya reaksi hipersensitifitas tipe I dan IV yang disertai anafilaktik parah, gagal nafas hingga kematian. Hal lain yang dapat terjadi dari penggunaan klorheksidin berlebihan adalah peningkatan adaptasi dan resistensi

mikroorganisme target yang perlu dibunuh (Azzahra dan Hayati, 2018; Brookes *et al.*, 2020).

2.5 Uji Antibakteri

Uji daya hambat antibakteri dapat dilakukan dengan menggunakan 2 metode, yaitu metode dilusi dan metode difusi. Metode dilusi dibedakan menjadi 2 jenis yaitu dilusi cair untuk menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan dilusi padat untuk menentukan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) pada suatu bakteri. Uji KHM dan KBM ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi minimal zat antibakteri dalam menghambat bakteri uji. Dilusi cair dilakukan dengan membuat pengenceran serial atau *serial dilution* bahan antibakteri pada media cair yang sudah diinokulasikan bakteri uji, sedangkan dilusi padat dilakukan dengan menggunakan media padat dari pengenceran bahan antibakteri kemudian dilakukan inokulasi bakteri pada kondisi tertentu (Karim *et al.*, 2018; Fitriana *et al.*, 2019).

Metode difusi merupakan metode yang paling sering dilakukan dalam proses analisis kemampuan antibakteri dari suatu bahan. Mekanisme kerjanya adalah senyawa antibakteri yang telah diteteskan pada media padat yang telah diinokulasikan bakteri yang kemudian dilakukan pengukuran ada atau tidaknya zona hambat bening yang terbentuk. Metode ini memiliki 3 jenis yaitu metode sumuran, metode silinder, dan metode cakram (Nurhayati *et al.*, 2020).

Metode sumuran dilakukan dengan membuat lubang pada media agar yang kemudian diisi senyawa antibakteri kemudian diukur zona hambatan di sekeliling lubang. Kelebihan metode sumuran ini adalah lebih mudah untuk menghitung luas zona hambatan yang terbentuk karena bakteri beraktivitas di permukaan atas nutrisi agar hingga sampai permukaan bawah (Haryati *et al.*, 2017; Retnaningsih *et al.*, 2019).

Metode silinder menggunakan silinder berbahan *aluminium foil* yang diletakkan di media agar yang telah diinokulasikan bakteri. Kemudian silinder diisi bahan antibakteri dan diuji lalu dihitung diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar silinder (Tenda *et al.*, 2017).

Metode difusi cakram menggunakan cakram untuk media tetesan bahan antibakteri yang kemudian diletakkan pada media agar yang telah diinokulasikan bakteri uji. Kemudian *petridish* diinkubasi dan dilanjutkan dengan penghitungan zona bening yang terbentuk disekitar *paper disk* dengan jangka sorong. Kelebihan metode ini adalah mudah dilakukan karena bisa dilakukan dalam jumlah banyak dalam sekali pengujian (Haryati *et al.*, 2017; Nurhayati *et al.*, 2020).

Uji antibakteri kemudian dilanjutkan tahap pengamatan dan perbandingan diameter zona hambat yang diteliti dengan kriteria kekuatan diameter zona hambat yang dibagi menjadi 4 yaitu kategori sangat kuat dengan diameter >20 mm, kategori kuat dengan diameter $\pm 10-20$ mm, kategori sedang dengan diameter $\pm 5-10$ mm, dan kategori lemah dengan diameter <5 mm (Davis dan Stout, 1971).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu rangkaian proses pemisahan zat aktif dari suatu benda padat maupun cair yang dibantu oleh pelarut. Tujuan utamanya adalah untuk mendapatkan bahan aktif yang belum diketahui maupun yang sudah diketahui, mengetahui senyawa-senyawa dengan struktur sejenis, mendapatkan metabolit sekunder dari tanaman yang diteliti, serta mengidentifikasi semua senyawa metabolit dalam tanaman yang menjadi target penelitian (Endarini, 2016).

Teknik ekstraksi yang ideal merupakan rangkaian ekstraksi untuk mendapatkan zat aktif semaksimal mungkin, cepat, dengan biaya terjangkau, mudah dilakukan, serta memiliki hasil yang konsisten setiap saat. Terdapat dua macam metode ekstraksi, yaitu metode ekstraksi konvensional dan metode ekstraksi modern (Endarini, 2016).

2.6.1 Metode Ekstraksi Konvensional

a. Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan kasar sampel tumbuhan dengan pelarut sesuai dalam wadah tertutup dengan tujuan mengambil senyawa aktif didalamnya dengan menggunakan pemanasan rendah. Metode ini sangat direkomendasikan pada jenis

tanaman *thermolabile* (tidak tahan panas) (Julianto, 2018; Chairunnisa *et al.*, 2019).

b. Perkolasi

Perkolasi merupakan metode ekstraksi yang membutuhkan alat perkolator berbentuk silinder dengan kran dibawahnya. Metode ini paling sering digunakan untuk mengekstraksi bahan aktif pada tumbuhan. Perkolasi dimulai dengan membasahi sampel tumbuhan dengan pelarut yang sesuai dan didiamkan selama 4 jam dengan kondisi tangki tertutup. Dilakukan penambahan pelarut hingga seluruh sampel terendam, kemudian dilanjutkan metode maserasi selama 1x24 jam. Kemudian saluran tempat keluar hasil ekstraksi dibuka dan dibiarkan untuk menetes. Penambahan pelarut dilakukan hingga hasil ekstrak $\pm 3/4$ dari jumlah ekstrak yang diperlukan (Mukhriani, 2014; Endarini, 2016; Julianto, 2019).

c. Sokhletasi

Ekstraksi ini dilakukan dengan menempatkan ekstrak kasar tanaman pada kertas saring kemudian dimasukkan ke alat *sokhlet* untuk diekstraksi. Pelarut didalamnya dipanaskan, kemudian uap akan mengembun pada *condenser* dan turun ke gulungan kertas saring berisi serbuk. Kontak embunan ini yang akan mengekstraksi bahan aktif didalamnya. Proses ini berlangsung secara *continue* dan dilanjut hingga pelarut terakhir tidak membawa sisa residu ketika diuapkan (Endarini, 2016; Julianto, 2019).

2.6.2 Metode Ekstraksi Modern

a. *Microwave-Assisted Extraction*

Ekstraksi ini menggunakan gelombang mikro untuk membantu proses pemisahan zat aktif sampel tumbuhan. Ekstraksi dengan *microwave* ini akan memanaskan seluruh sampel secara bersamaan. Pemanasan ini akan merusak ikatan hidrogen lemah karena dipol molekul yang berotasi dan ion terlarut yang bermigrasi sehingga meningkatkan penetrasi pelarut masuk kedalam sampel (Julianto, 2019).

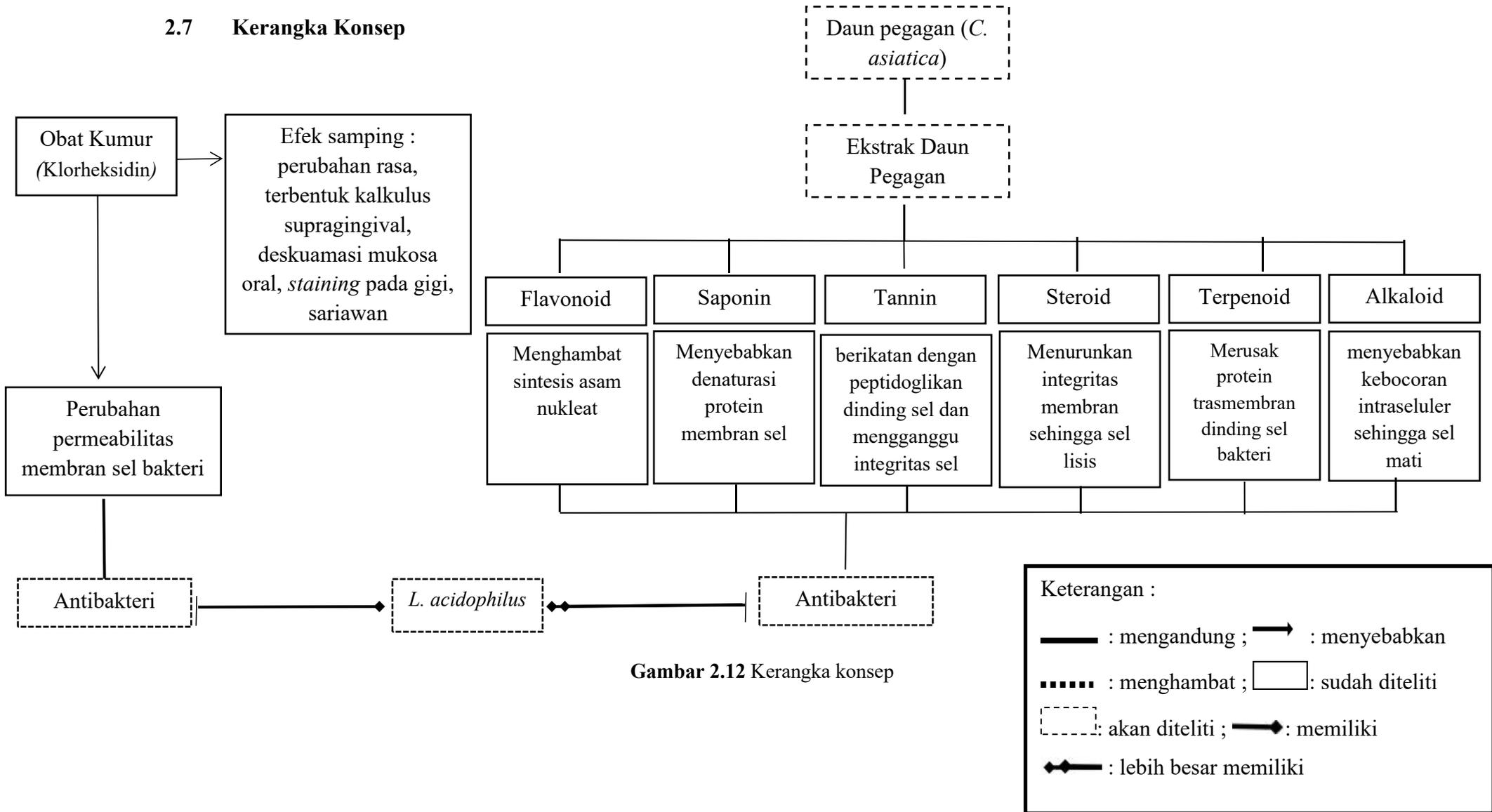
b. *Ultrasound-Assisted Extraction*

Ultrasound-Assisted Extraction merupakan metode ekstraksi yang canggih yang dapat mengekstraksi senyawa aktif sampel tumbuhan dalam jumlah besar dan dalam waktu yang singkat. Metode ini digunakan pada suhu rendah, sehingga sangat direkomendasikan pada jenis tanaman termolabil atau merupakan senyawa termal tidak stabil (Julianto, 2019).

c. *Supercritical Fluid Extraction*

Supercritical Fluid Extraction merupakan metode untuk mengekstraksi senyawa aktif pada tumbuhan dengan bantuan gas superkritis seperti karbondioksida, propane, sulfur dioksida, nitrogen, ammonia, propilena, nitrogen oksida, etana, etilen, sulfur heksafluorida, dan metana saat suhu dan tekanan lebih rendah. Metode ini menempatkan sampel tumbuhan dalam bejana berisi gas dalam kondisi suhu dan tekanan yang terkendali (Julianto, 2019).

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.12 Kerangka konsep

2.8 Penjelasan Kerangka Konsep

Bakteri *L. acidophilus* merupakan salah satu bakteri penyebab terjadinya keparahan karies gigi. Bakteri ini memiliki beberapa faktor virulensi yang diantaranya EPS, asam laktat dan *S-Layer*. Dengan adanya faktor virulensi tersebut dapat membantu bakteri berada di lingkungan yang asam sehingga memicu terjadinya ketidakseimbangan demineralisasi dan remineralisasi jaringan keras gigi, sehingga terjadi keparahan proses karies.

Upaya pencegahan karies gigi dapat dilakukan dengan pemberian obat kumur yang mengandung zat antibakteri seperti klorheksidin. Klorheksidin terbukti efektif dalam kemampuan membentuk perlekatan pada membran sel bakteri sehingga dapat menyebabkan keluarnya sitoplasma bakteri dan menyebabkan kematian sel bakteri. Namun klorheksidin dapat menimbulkan banyak efek samping merugikan seperti perubahan rasa, terbentuk kalkulus supragingival, deskuamasi mukosa oral, *staining* pada gigi, dan sariawan bagi penggunaannya apabila digunakan dalam jangka waktu yang lama tanpa pengawasan dokter. Sehingga diperlukan alternatif lain yang dapat menggantikan peran klorheksidin dengan lebih efektif dan efek samping yang minimal, yaitu dengan ekstrak tumbuhan alami yaitu ekstrak daun pegagan. Ekstrak daun pegagan ini memiliki kandungan yang berperan sebagai zat antibakteri seperti flavonoid, saponin, tannin, steroid, alkaloid dan terpenoid.

Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri dibagi menjadi 3 bagian yaitu dengan dengan menghentikan sintesis DNA dan RNA sehingga dapat menghambat terbentuknya asam nukleat bakteri (Ulanowska *et al.*, 2006), menghambat fungsi membran sel bakteri dengan melepaskan kalium pada dinding sel, sehingga menyebabkan kerusakan langsung pada dinding sel bakteri (Cushnie dan Lamb, 2005), serta menghambat metabolisme energi bakteri dengan cara mengubah membran luar dan sitoplasma sel, sehingga mengganggu pertukaran nutrisi dan metabolit sel dan akhirnya menghambat pasokan energi untuk kehidupan bakteri (Eumkeb dan Chunkrathok, 2013). Mekanisme tannin sebagai antibakteri adalah dengan berikatan dengan peptidoglikan dinding sel dan mengganggu integritas sel untuk fungsi antibakteri sehingga dapat menghambat

formasi atau pembentukan biofilm pada bakteri (Dong *et al.*, 2018). Mekanisme saponin sebagai antibakteri adalah mendenaturasi protein membran sel bakteri hingga lisis, menghancurkan permeabilitas dinding sel bakteri, serta memodifikasi lipid membran sel sehingga bakteri sulit berinteraksi sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk mematikan bakteri (Johnson, 2013).

Mekanisme steroid sebagai antibakteri adalah dengan mengakibatkan kebocoran lisosom serta berinteraksi dengan fosfolipid sehingga integritas membran bakteri turun dan sel bakteri menjadi rapuh (Epanand *et al.*, 2007). Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah dengan bereaksi bersama protein transmembran pada dinding sel bakteri, kemudian membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga dapat mendenaturasikan porin di membran tempat keluar masuknya senyawa sehingga permeabilitas sel turun dan bakteri kekurangan asupan nutrisi dan bakteri menjadi mati (Cowan, 1999). Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah berikatan dengan membran fosfolipid dan kelompok fosfat (komponen asam nukleat) sehingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler bakteri. Hal tersebut dapat menurunkan integritas struktur membran sel yang dapat memicu kematian bakteri (Li *et al.*, 2014).

Penelitian ini menguji efek antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus*. Penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui potensi peningkatan konsentrasi ekstrak terhadap kemampuan antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus*. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan kemampuan antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap klorheksidin 0,2% terhadap *L. acidophilus*.

2.9 Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Terdapat efek antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap *L. acidophilus*.
2. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) maka semakin besar potensi antibakteri terhadap *L. acidophilus*.

3. Ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) memiliki kemampuan antibakteri setara dengan khlorheksidin 0,2% terhadap *L. acidophilus*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu *experimental study* dengan cara mengontrol dan mengendalikan variabel lain untuk mengetahui pengaruh sebab akibat perlakuan variabel-variabel tertentu (Muhajirin dan Panorama, 2017). Penelitian yang menguji efek ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus* akan dilakukan dengan eksperimental laboratorium secara *in vitro* (Timotius, 2017).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dilakukan yaitu *post test only control group design* yang pengamatannya dilakukan setelah eksperimen dilakukan. Pengamatan dilakukan dengan membedakan hasil observasi dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol setelah eksperimen (Swarjana, 2015; Irmawartini *et al.*, 2017).

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

3.3.1 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan pada bulan Februari 2022 - April 2022.

3.3.2 Tempat Penelitian

- a. Identifikasi bakteri *L. acidophilus* dan penelitian daya antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- b. Identifikasi daun pegagan dilakukan di Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember.
- c. Pembuatan ekstrak daun pegagan dengan metode maserasi dilakukan di Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% (Hayati *et al.*, 2013).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu daya antibakteri yang ditunjukkan dengan adanya zona hambat ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap *L. acidophilus*.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini yaitu kriteria daun pegagan, media biakan bakteri dalam *petridish*, jenis bakteri *L. acidophilus*, dan metode penelitian.

3.5 Definisi Operasional Variabel Penelitian

3.5.1 Ekstrak Daun Pegagan

Ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) didapatkan dari hasil proses maserasi simplisia daun pegagan dengan pelarut etanol 96% selama 3 hari dengan perbandingan 1:8 yang kemudian dimasukkan ke dalam rotary evaporator hingga didapatkan ekstrak kental 100%. Kemudian dilakukan pengenceran konsentrasi ekstrak menjadi konsentrasi 50%, 75 %, dan 100% perbandingan 1:1 dengan menggunakan akuades (Hayati *et al.*, 2013).

3.5.2 *L. acidophilus*

Bakteri *L. acidophilus* pada penelitian ini diperoleh Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada. Identifikasi bakteri dilakukan dengan uji pewarnaan Gram di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan disuspensikan sesuai standar McFarland 0,5 setara konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

3.5.3 Daya Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (*C. asiatica*)

Daya antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) adalah kemampuan antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap *L. acidophilus* yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening atau jernih dan tidak mengandung bakteri di sekeliling *paper disk* yang ditetesi ekstrak daun pegagan.

3.6 Sampel Penelitian

3.6.1 Pengelompokan Sampel

Sampel yang digunakan terbagi kedalam 5 kelompok, yaitu:

- a. Kelompok K(+) : Kontrol positif (Klorheksidin 0,2%)
- b. Kelompok K(-) : Kontrol negatif (Aquadest steril)
- c. Kelompok 1 : Ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 50%
- d. Kelompok 2 : Ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 75%
- e. Kelompok 3 : Ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 100%

3.6.2 Jumlah Sampel

Untuk menghitung jumlah sampel pada penelitian ini digunakan rumus perhitungan Federer menurut Federer (1967) yaitu sebagai berikut:

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

Keterangan:

t = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

15 = konstanta

Perhitungan sampel:

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

$$(5 - 1)(n - 1) \geq 15$$

$$4(n - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) \geq \frac{15}{4}$$

$$n - 1 \geq 3,75$$

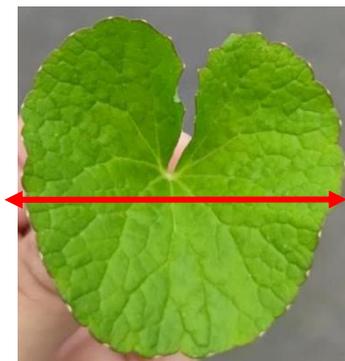
$$n \geq 3,75 + 1$$

$$n \geq 4,75$$

Berdasarkan perhitungan sampel tersebut didapatkan nilai n atau jumlah sampel minimal sebesar 4,75 yang dibulatkan menjadi 5. Maka pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali pada tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias. Sehingga jumlah total sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 25 sampel.

3.6.3 Kriteria Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*). Ekstrak tersebut didapatkan dari daun pegagan yang diperoleh dengan kriteria pengambilan bagian daunnya saja, tidak termasuk batang, akar, bunga, dan buahnya, daun sudah tergolong daun dewasa dan dalam keadaan segar serta hasil petik langsung oleh petani dari kebun di Politeknik Negeri Jember. Daun pegagan pada penelitian dipetik pada sore hari dengan kriteria berbentuk ginjal, dengan sedikit gerigi di bagian tepi daun, rata rata lebar dengan garis tengah daun 4-5 cm (Gambar 3.1), berwarna hijau segar tidak termasuk daun berwarna hijau kekuningan, oranye, maupun kecoklatan. Berdasarkan kriteria tersebut, maka daun yang telah dipanen perlu dilakukan penyortiran langsung oleh peneliti (Sutardi, 2016).



Gambar 3.1 Kriteria pengukuran daun pegagan pada penelitian

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

- a. Autoklaf (*Gea tipe LS-50LJ* (China))
- b. Ayakan (60 mesh (Indonesia))
- c. Bejana gelap (Indonesia)
- d. Blender (*Miyako BL 152 PFAP* (Indonesia))
- e. Pinset steril (OneMed, Indonesia)
- f. Bunsen (Indonesia)
- g. Cawan petri atau *petridish* (*Pyrex* (Indonesia))
- h. Gelas Ukur 1000ml (*Pyrex* (Indonesia))

- i. *Hotplate stirrer (Pyrex (Indonesia))*
- j. Inkubator (*WTC Binder BD 53 (Indonesia), Memmert (Germany)*)
- k. Jangka sorong (*Inoki (Japan)*)
- l. Kertas saring (*Whatman no. 41 (Indonesia)*)
- m. *Laminar flow (Super Clean Bench RRC HF-100 (China))*
- n. Mikropipet (*Eppendorf 200 µl dan 1000 µl (Germany)*)
- o. Mikroskop cahaya Trinocular (*Olympus CX33 (Japan)*)
- p. Neraca (*Ohaus MB2610 (Indonesia)*)
- q. *Object glass (Sail Brand (China))*
- r. Oven (*Memmert tipe IN 55 (Germany)*)
- s. Rak tabung reaksi (Indonesia)
- t. *Rotary Evaporator dan Labu (Heidolph tipe Hei-VAP (Indonesia))*
- u. Spektrofotometer (*Thermo Spectronic 20D Milton Roy (America)*)
- v. *Cotton Swab steril (Indonesia)*
- w. Tabung erlenmeyer 500 ml (*Pyrex no. 4980 (Indonesia)*)
- x. Tabung reaksi (*Pyrex TE-32 (Indonesia)*)
- y. Timbangan digital (*Ohaus PA214 (Indonesia)*)
- z. *Vortex (Faithful MX-S (China))*
- aa. *Wire loop atau ose (Pyrex (Indonesia))*

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan yaitu:

- a. Akuades steril (25 ml, *Otsu-Wi (Indonesia)*)
- b. Alkohol 70% (*OneMed (Indonesia)*)
- c. Bakteri *L. acidophilus* Food and Nutrition Culture Collection (FNCC) 0051 (Universitas Gadjah Mada)
- d. Daun pegagan (*C. asiatica*) (Politeknik Negeri Jember)
- e. Etanol 96% (JK Care (Indonesia))
- f. Klorheksidin glukonat 0.2% (*Minosep (Indonesia)*)
- g. Masker (*OneMed (Indonesia)*) dan *handscoen (Maxter (Indonesia))*
- h. MRS-B (*Mannitol Rogosa and Sharpe- Broth*)(*MERCK 6,82 gr (Germany)*)

- i. MRS-A (*Mannitol Rogosa and Sharpe-Agar*) (MERCK 52,2 gr (Germany))
- j. *Blank disk/Paper disk* (diameter 5 mm, Oxoid (United Kingdom))

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahapan Persiapan

Tahapan persiapan pada penelitian ini meliputi:

- a. Pembuatan *Ethical Clearance*

Pembuatan *ethical clearance* dilakukan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (No. 1465/UN25.8/KEPK/DL/2022).

- b. Identifikasi Tanaman Pegagan

Tanaman pegagan (*C. asiatica*) diambil dan diidentifikasi di Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember.

- c. Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu dengan sabun, dibilas dan dikeringkan. Alat yang terbuat dari kaca disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm, untuk kawat ose dibakar diatas api bunsen baik sebelum maupun sesudah digunakan, sedangkan untuk alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih lalu diulas alkohol 70%.

- d. Pembuatan Ekstrak Daun Pegagan

Daun pegagan yang digunakan adalah daun sudah tergolong dewasa dan dalam keadaan segar berwarna hijau sesuai kriteria sampel daun pegagan dalam penelitian yang diperoleh dari Politeknik Negeri Jember pada sore hari yang kemudian ditimbang, dicuci bersih di bawah air mengalir. Daun pegagan, ditiriskan, diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung untuk menghilangkan sisa air dalam daun. Kemudian daun pegagan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 40-50⁰ C selama 36 jam atau daun sampai benar benar kering. Pengeringan oven perlu dilakukan untuk memastikan daun benar benar kering dari air, sehingga dapat membuat daun lebih tahan lama dan terhindar dari kontaminasi jamur dan bakteri lain yang dapat mempengaruhi kemurnian ekstrak yang akan dibuat (Julianto, 2018). Daun pegagan yang sudah kering dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan ayakan 60 mesh (Azzahra dan

Hayati, 2018) hingga mendapatkan bentukan serbuk halus. Serbuk halus daun pegagan dimasukkan ke dalam tabung gelap kemudian dituangkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan simplisia serbuk dengan pelarut etanol 1:8 (Kemenkes RI, 2017; Rahmaniati *et al.*, 2018; Djoko *et al.*, 2020).

Metode maserasi dilakukan selama 3 hari (72 jam) pada suhu ruangan tanpa terkena sinar matahari secara langsung serta dilakukan pengadukan 2 kali dalam sehari agar etanol dapat meresap ke seluruh bagian simplisia daun pegagan. Setelah perendaman 3 hari selesai dilakukan, larutan disaring menggunakan kertas saring atau *vacum filtrate*. Kemudian dilakukan pemadatan larutan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C selama kurang lebih 3 jam lalu diangin-anginkan sampai tidak ada pelarut yang menetes dan terbentuk ekstrak kental dengan konsentrasi 100%. Hal ini dilakukan beberapa kali hingga terbentuk ekstrak dengan berat yang konstan pada *rotary evaporator*, sehingga kandungan etanol dalam ekstrak daun pegagan dapat dianggap telah menguap dan menyisakan ekstrak asli (Depkes RI, 2000).

e. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Pegagan

Konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 50%, 75%, dan 100%. Menurut Saridewi (2017), pembuatan konsentrasi ekstrak daun pegagan dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$V1.M1 = V2.M2$$

Keterangan:

- V1 : Volume awal ekstrak daun pegagan sebelum pengenceran
- V2 : Volume akhir ekstrak daun pegagan setelah pengenceran
- M1 : Konsentrasi awal ekstrak daun pegagan sebelum pengenceran
- M2 : Konsentrasi akhir ekstrak daun pegagan setelah pengenceran

Untuk mendapatkan hasil konsentrasi ekstrak 1:1 yang dibutuhkan sebagai perlakuan, ekstrak daun pegagan diencerkan dengan menggunakan aquades. Pada penelitian ini membutuhkan volume akhir ekstrak daun pegagan setelah pengenceran (V_2) sekitar kurang lebih 2 ml, oleh karena keperluan apabila

dikhawatirkan terdapat hal hal diluar dugaan, seperti kegagalan trial maupun ketidakcukupan bahan penelitian saat proses penelitian berlangsung.

1. Pembuatan konsentrasi 100% 5 ml 1:1 membutuhkan 2,5 gr ekstrak daun pegagan ditambahkan dengan 2,5 ml akuades steril.
2. Untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak daun pegagan 75% sebanyak 2 ml:

$$V1 \cdot 100\% = 2 \cdot 75\%$$

$$V1 = \frac{150}{100}$$

$$V1 = 1,5 \text{ ml}$$

Volume pelarut yang dibutuhkan:

$$V2 - V1 = 2 - 1,5 \text{ ml}$$

$$= 0,5 \text{ ml}$$

Jadi konsentrasi 75% ekstrak daun pegagan didapatkan dari 1,5 ml ekstrak daun pegagan konsentrasi 100% yang ditambahkan volume pelarut 0,5 ml akuades steril.

3. Untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak daun pegagan 50% sebanyak 2 ml:

$$V1 \cdot 100\% = 2 \cdot 50\%$$

$$V1 = \frac{100}{100}$$

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

Volume pelarut yang dibutuhkan:

$$V2 - V1 = 2 - 1 \text{ ml}$$

$$= 1 \text{ ml}$$

Jadi konsentrasi 50% ekstrak daun pegagan didapatkan dari 1 ml ekstrak daun pegagan konsentrasi 100% ditambahkan volume pelarut 1 ml akuades steril.

f. Identifikasi Bakteri *L. acidophilus*

Uji identifikasi bakteri pada penelitian ini menggunakan uji pewarnaan Gram. Hal ini bertujuan agar dapat mengelompokkan bakteri berdasarkan reaksi kimianya yaitu Gram positif yang diindikasikan dengan terbentuknya warna violet

atau Gram negatif yang diindikasikan terbentuk warna merah. Proses pewarnaan Gram ini juga akan dapat menampilkan bentuk morfologi dari bakteri yang diteliti (Hidayat, 2015).

Uji pewarnaan Gram ini dilakukan dengan meneteskan 1-2 tetes akuades steril pada *object glass*. Lalu biakan bakteri sebanyak 1 ose disebar, tunggu hingga kering, kemudian lalui pada bunsen api hingga terasa sedikit panas. Kemudian teteskan larutan kristal ungu, tunggu 1 menit dan bilas dengan akuades steril pada botol semprot selama 2 detik dan tunggu kering. Kemudian teteskan larutan iodium, tunggu 1 menit, lalu bilas dengan akuades steril atau air mengalir secara perlahan selama 2 detik dan tunggu kering. Selanjutnya, teteskan etanol 95%, kemudian tunggu 10-15 detik atau secepatnya dan bilas dengan akuades dalam botol semprot dan tunggu kering. Tahap akhir, tetesi dengan larutan safranin dan didiamkan 30-60 detik, lalu dicuci dan dikeringkan, serta amati dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran kuat (Smith dan Hussey, 2016). Berdasarkan uji pewarnaan gram pada bakteri, terdapat 2 kelompok bakteri, yaitu bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Setelah dilakukan proses pembilasan, sel bakteri Gram negatif akan memunculkan warna merah muda atau cenderung *pink*, sedangkan sel bakteri Gram positif akan memunculkan warna kristal violet (Putri *et al.*, 2017).

g. Pembuatan Media MRS-A (*Mannitol Rogosa and Sharpe-Agar*)

Tahapan pembuatan media MRS-A (Hakim *et al.*, 2018) ini dimulai dengan menimbang bubuk MRS-A sebesar 34,1 gr lalu dicampurkan dengan 500 ml akuades steril dalam gelas beaker. Campuran dipanaskan hingga mendidih dan homogen sempurna dengan bantuan *magnetic stirrer* pada *hotplate* selama kurang lebih 20 menit pada suhu 150°C. Media MRS-A ini dibuat homogen hingga terlihat warna kuning bening. Kemudian masukkan media MRS-A ke dalam tabung erlenmeyer 500 ml, ditutup kapas steril, dibungkus dengan kertas pada ujung tutupnya dan ditali dengan karet baru kemudian disterilkan pada autoklaf 121°C dengan tekanan 1 atm (Yusmaniar *et al.*, 2017) selama 15-20 menit. Media MRS-A yang sudah jadi dimasukkan ke *petridish* steril dan didiamkan pada suhu ruang. Setelah memadat, media MRS-A disimpan dalam lemari es dengan suhu

4°C. Dilanjutkan dengan uji sterilisasi dengan cara melakukan inkubasi media MRS-A pada suhu 37° C selama 24 jam untuk melihat dan memastikan apakah media MRS-A yang dibuat tidak terkontaminasi dengan perkembangan bakteri lain (Mansur *et al.*, 2019; Larijani *et al.*, 2021).

h. Pembuatan Media MRS-B (*Mannitol Rogosa Sharpe- Broth*)

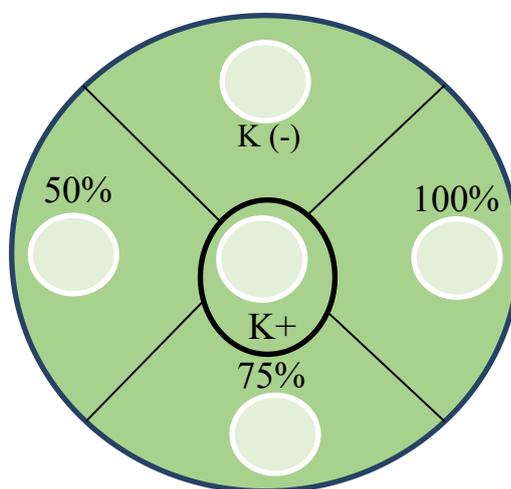
Pembuatan media MRS-B diawali dengan menimbang 26,1 gr bubuk MRS-B yang dicampur dengan 500 ml akuades steril dalam tabung erlenmeyer. Kemudian dilakukan pemanasan dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga mendidih dan homogen. Media MRS-B yang sudah jadi disterilkan di autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm (Yusmaniar *et al.*, 2017) selama 15 menit. Selesai pensterilan, media MRS-B dituangkan ke dalam tabung reaksi steril, baru kemudian disimpan di dalam lemari es. Dilanjutkan dengan uji sterilisasi dengan cara melakukan inkubasi media MRS-B pada suhu 37° C selama 24 jam untuk melihat dan memastikan media MRS-B yang dibuat tidak terkontaminasi dengan perkembangan bakteri lain (Mansur *et al.*, 2019).

i. Pembuatan Suspensi Bakteri *L. acidophilus*

Pembuatan Suspensi Bakteri *L. acidophilus* dilakukan di LAF (*Laminar Air Flow*). *L. acidophilus* yang didapatkan dari Pusat Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada dalam tabung reaksi berisi media agar miring MRS-B, diambil sebanyak 1 ose dengan kawat ose, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi media cair MRS-B sebanyak 2 ml. Kemudian tabung reaksi ditutup kapas dan untuk memperoleh suasana anaerob fakultatif, *petridish* diletakkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri dalam tabung reaksi ditandai dengan terbentuknya kekeruhan didalamnya. Suspensi bakteri *L. acidophilus* dilakukan pengocokan dengan vortex kemudian diukur tingkat kekeruhannya dengan spektrofotometer berdasarkan standar McFarland 0.5 (Azzahra dan Hayati, 2018). Penyesuaian larutan suspensi bisa dilakukan dengan penambahan larutan 0,9% NaCl (Hudzicki, 2016) maupun dengan penambahan isolat bakteri hingga setara dengan kekeruhan larutan McFarland 0.5 yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/ml dengan panjang gelombang 625 nm sesuai standar McFarland (Hudzicki, 2016).

j. Pemberian Label

Tahap pemberian label ini diawali dengan menyiapkan total 5 buah *petridish*, karena dilakukan 5 kali pengulangan dan setiap percobaan menggunakan 1 buah *petridish*. Untuk membedakan tiap pengulangan, *petridish* diberi tanda huruf abjad 1, 2, 3, 4, dan 5 secara berurutan yang menandakan pengulangan pertama hingga pengulangan kelima. Dalam *petridish* diberi label sesuai bahan yang ditetaskan yaitu K(+), K(-), ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% (Gambar 3.2). *Petridish* yang digunakan adalah *petridish* berdiameter standar penelitian yaitu 9 cm.



Gambar 3.2 Ilustrasi pemberian label pada *petridish* penelitian

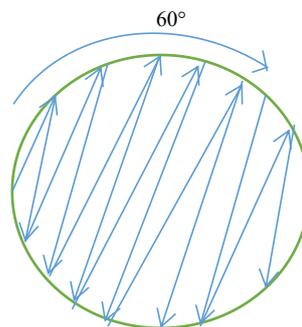
k. Pembuatan Rekultur Bakteri

Bakteri *L. acidophilus* dari Pusat Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada dilakukan rekultur bakteri untuk mempertahankan daya tumbuh (viabilitas) dan keberlangsungan hidup bakteri di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Dilakukan inokulasi bakteri menggunakan kawat ose dengan metode gores (*streaking*) pada media MRS-A di dalam *petridish*. Kawat ose dipanaskan diatas api bunsen supaya steril kemudian digunakan untuk mengambil 1 ose biakan suspensi bakteri *L. acidophilus* dari media cair MRS-B yang sudah setara dengan standar McFarland 0,5. Kemudian

kawat ose digoreskan secara *zigzag* pada media agar padat MRS-A pada *petridish*. Kemudian *petridish* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (CLSI, 2012).

3.8.2 Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus* pada penelitian ini menggunakan uji *disk diffusion* atau biasa dikenal dengan metode difusi cakram. Metode ini dikenal sebagai metode yang sering digunakan dalam uji antibakteri karena kemudahan bahan dan cara uji serta dapat dilakukan dalam waktu yang singkat (Nurhayati *et al.*, 2020). Metode difusi cakram dilakukan dengan menyiapkan *paper disk* berdiameter 5 mm yang telah ditetesi bahan antibakteri yang pada penelitian ini menggunakan ekstrak daun pegagan. *Paper disk* kemudian diletakkan ke dalam *petridish* berisi media agar biakan bakteri yang telah disiapkan. Inokulasi bakteri tersebut dilakukan dengan menggunakan *cotton swab* steril yang dicelupkan ke dalam tabung reaksi suspensi bakteri standar McFarland 0,5. Untuk menghilangkan cairan berlebih, *cotton swab* steril diputar dan ditempelkan pada dinding kaca tabung reaksi dengan sedikit tekanan. Inokulasi bakteri dilakukan dengan gerakan *streaking* atau menggores seluruh permukaan *petridish* dengan *cotton swab* steril sebanyak 3 kali dengan memutar 60° searah jarum jam pada tiap arah goresan dan mengenai tepi *petridish* untuk memastikan pendistribusian biakan bakteri merata sempurna ke seluruh permukaan agar (Gambar 3.3) (CLSI, 2012).



Gambar 3.3 Ilustrasi *streak method* pada media MRS-A di *petridish* dengan tiga kali putaran dengan sudut 60° searah jarum jam

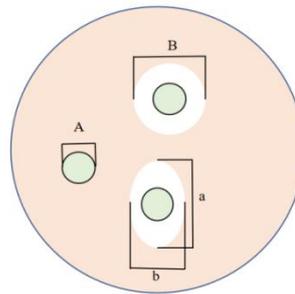
Paper disk sejumlah 5 untuk satu *petridish* atau sekali percobaan, masing masing ditetesi klorheksidin sebagai kontrol positif, kontrol negatif, ekstrak daun

pegagan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% sehingga dalam penelitian ini membutuhkan total 25 sampel *paper disk* untuk 5 kali pengulangan. Perlakuan masing masing variabel pada *paper disk* ini ditetesi sebanyak 50 μ L (Vadlapudi *et al.*, 2012; Agneeswari *et al.*, 2019) dengan mikropipet, kemudian tiap *paper disk* diletakkan pada *petridish* yang sudah diinokulasikan bakteri sesuai dengan label tertera dengan menggunakan pinset steril. Perlakuan diulang sebanyak 5 kali pengulangan pada tiap *petridish* dengan keterangan angka sebagai pembeda urutan pengulangan. Penempatan masing masing *paper disk* harus berjarak kurang lebih 2,4 cm dari *paper disk* lainnya. *Petridish* kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam dalam posisi terbalik (Hudzicki, 2016).

3.8.3 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Pengukuran zona hambat dilakukan setelah tahapan inkubasi selama 24 jam dengan menggunakan jangka sorong di sekitar *paper disk* pada masing masing kelompok penelitian. Pengukuran dilakukan oleh 3 pengamat yang berbeda dan diambil rata-rata hasil yang didapatkan (Nurhayati *et al.*, 2020). Pengukuran zona hambat bertujuan melihat area bening di sekitar *paper disk* untuk menunjukkan ada tidaknya pertumbuhan bakteri. Pengukuran diameter zona hambat ini dilakukan pada *petridish* dalam kondisi terbalik (CLSI, 2012).

Diameter zona hambat dihitung dari tepi hingga tepi lingkaran melewati pusat *paper disk*. Apabila zona bening tidak tampak maka dihitung 0 mm. Apabila ditemukan zona hambat bening berbentuk oval maka penghitungan dilakukan dengan mengalikan diameter panjang dan diameter pendek kemudian dibagi 2. Apabila ditemukan zona hambat terlalu besar atau *overlap* dengan zona hambat *paper disk* lainnya, penghitungan dilakukan pada zona hambat bening dari pusat *paper disk* ke tepi zona hambat dengan tepi yang terlihat kemudian dikalikan 2 (Gambar 3.4) (CLSI, 2012).



Gambar 3. 4 Ilustrasi pengukuran diameter zona hambat

Keterangan:

A: Tidak tampak adanya zona hambat bening di sekitar *paper disk*, maka penghitungan diberi nilai 0,0 mm.

B: Tampak terbentuk zona hambat bening di sekitar *paper disk*, penghitungan dilakukan dari tepi ke tepi tiap sisi kemudian dibagi 2.

a: Penghitungan diameter panjang

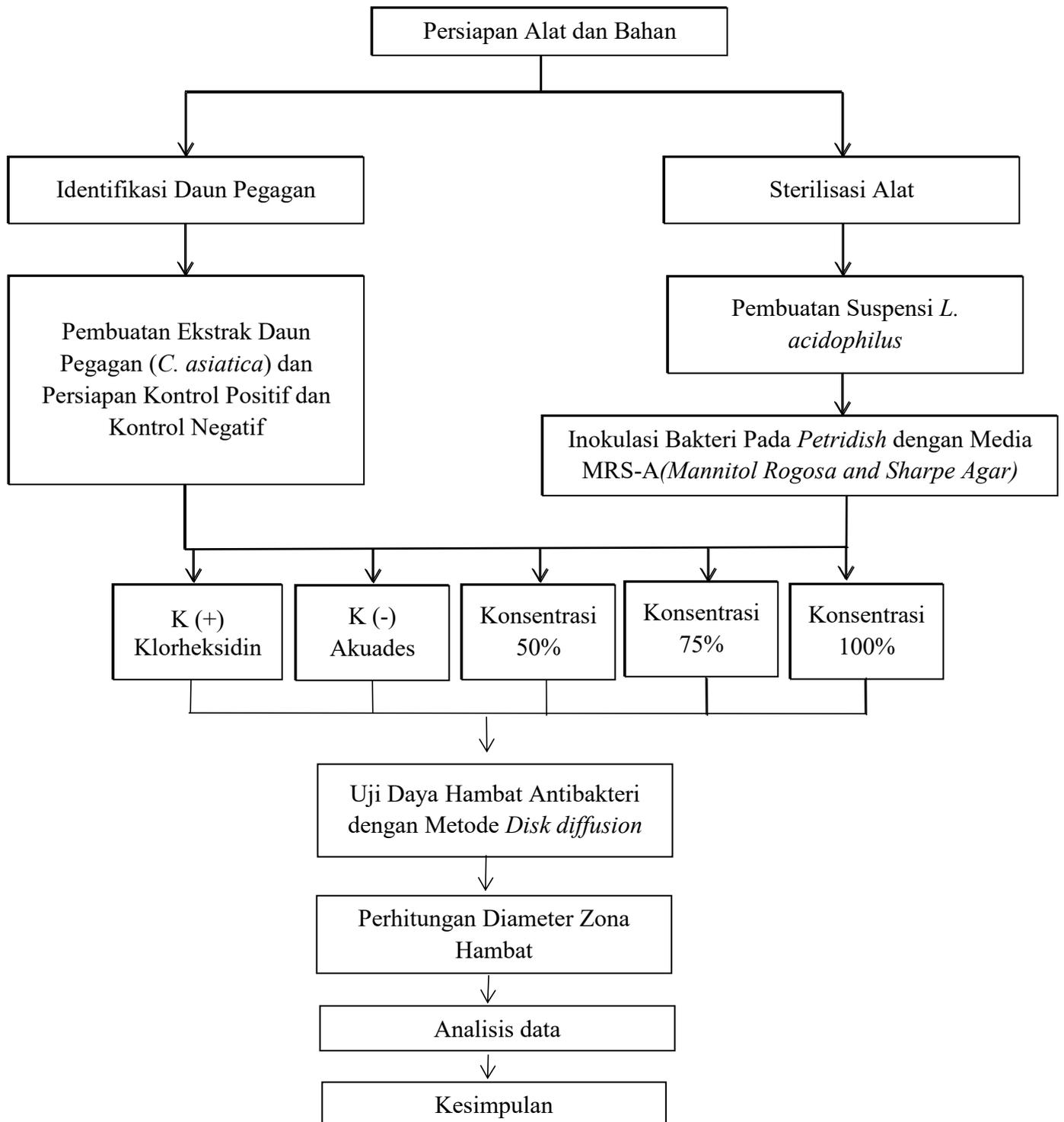
b: Penghitungan diameter lebar

○: *paper disk*, ○ : zona hambat, ○ : *petridish*

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis dengan menggunakan software statistik SPSS (*Statistical Products and Solution Services*). Uji yang pertama dilakukan adalah uji normalitas, pada penelitian ini menggunakan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dengan nilai signifikansi 95% ($p \leq 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas, yaitu *Levene Test* dengan nilai signifikansi 95% ($p \leq 0,05$). Jika data berdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik dengan nilai signifikansi 95% ($p \leq 0,05$) *One Way Anova* dan dilanjutkan dengan uji *post hoc Least Significance Different (LSD)*. Jika data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen atau salah satu diantaranya saja, maka dilakukan uji nonparametrik dengan nilai signifikansi 95% ($p \leq 0,05$) *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

3.10 Alur Penelitian

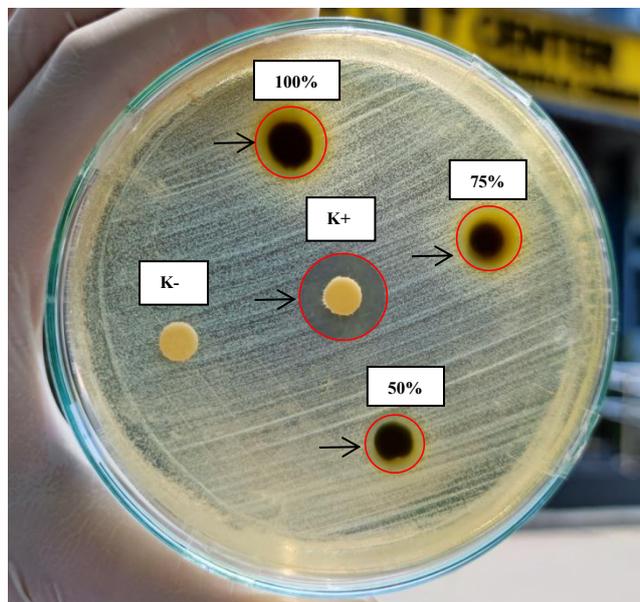


Gambar 3.5 Diagram Alur Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Hasil penelitian uji daya hambat antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap *L. acidophilus* yang dilakukan dengan menggunakan metode *disk diffusion* memperlihatkan zona jernih dan bersih dari bakteri yang biasa disebut dengan zona hambat. Zona hambat tersebut tampak berada di sekeliling *paper disk* yang masing-masing telah ditetesi ekstrak daun pegagan konsentrasi 50%, 75%, 100%, kontrol positif berupa klorheksidin 0,2%, dan kontrol negatif berupa akuades steril (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Zona hambat perlakuan kontrol positif, kontrol negatif, ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% terhadap *L. acidophilus* yang terbentuk di sekeliling *paper disk*

Pengukuran diameter zona hambat pada penelitian ini menggunakan jangka sorong. Pengukuran zona hambat yang telah terbentuk dilakukan pada *petridish* dalam kondisi terbalik dan diamati bagian zona hambat yang jernih dan menunjukkan tidak adanya koloni bakteri di dalamnya (CLSI,2012). Hasil pengukuran setiap kelompok perlakuan yang telah dilakukan akan dianalisis dengan *software statistik* SPSS dan didapatkan hasil rerata dan simpangan baku sebagai berikut (Tabel 4.1).

Tabel 4. 1 Hasil rerata dan simpangan baku diameter zona hambat (mm) ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap *L. acidophilus*

Kelompok Sampel	N	Diameter zona hambat $\bar{x} \pm SB$ (mm)
Ekstrak daun pegagan konsentrasi 100%	5	11,12 \pm 0,646
Ekstrak daun pegagan konsentrasi 75%	5	10,35 \pm 0,590
Ekstrak daun pegagan konsentrasi 50%	5	8,80 \pm 0,906
Kontrol Positif (+)	5	10,98 \pm 1,456
Kontrol Negatif (-)	5	0

N : Jumlah Pengulangan

\bar{x} : Rerata

SB : Simpangan baku

Data hasil pengukuran yang telah dipaparkan pada Tabel 4.1, pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) maupun kontrol positif telah terbukti memiliki kemampuan daya hambat dengan nilai yang berbeda. Terjadi peningkatan diameter zona hambat pada ekstrak daun pegagan seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak daun pegagan yang diberikan. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambat ekstrak daun pegagan konsentrasi 100% menunjukkan nilai terbesar sebesar 11,12 mm diikuti oleh kontrol positif (10,98 mm), ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% (10,35 mm) dan 50% (8,80 mm). Kelompok kontrol negatif (akuades steril) pada setiap perlakuan penelitian tidak menunjukkan adanya zona hambat di sekeliling *paper disk*, sehingga pada kelompok ini diberi nilai 0 mm yang artinya tidak memiliki kemampuan daya hambat terhadap *L. acidophilus*.

4.2 Analisis Data

Data yang telah didapat dilanjutkan dengan melakukan analisis data dengan menggunakan SPSS versi 25. Untuk melakukan analisis data, diawali dengan melakukan uji asumsi dasar berupa uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas merupakan uji untuk mengetahui apakah seluruh data sampel

penelitian berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas yang digunakan yaitu uji *Saphiro Wilk*, hal ini disebabkan oleh karena uji tersebut merupakan uji yang digunakan pada jumlah sampel penelitian kurang dari 50 sampel (Razali dan Wah, 2011). Hasil uji normalitas menunjukkan data berdistribusi normal apabila nilai signifikansi $p > 0,05$.

Tabel 4. 2 Hasil uji normalitas *Saphiro-Wilk*

Kelompok Sampel Penelitian	<i>Shapiro-Wilk</i>		
	Statistic	df	Sig.
Ekstrak daun pegagan konsentrasi 100%	0,940	5	0,666
Ekstrak daun pegagan konsentrasi 75%	0,819	5	0,114
Ekstrak daun pegagan konsentrasi 50%	0,847	5	0,184
Kontrol Positif (+)	0,834	5	0,149
Kontrol Negatif (-)	.	5	.

Data tertera pada Tabel 4.2 tersebut, dapat diketahui bahwa ekstrak daun pegagan konsentrasi 100% memiliki nilai signifikansi 0,666, ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% sebesar 0,114, ekstrak daun pegagan sebesar 0,184, dan kontrol positif sebesar 0,149. Sehingga dapat disimpulkan bahwa nilai signifikansi keempat kelompok sampel tersebut lebih besar dari nilai signifikansi 0,05, sehingga data sampel dapat dikatakan berdistribusi normal. Kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan nilai signifikansi uji normalitas karena tidak memiliki diameter zona hambat atau bernilai 0 mm.

Tabel 4.3 Hasil uji homogenitas data *Levene Test*

Hasil Pengukuran	<i>Levene Statistic</i>	df1	df2	Sig.
	2,279	4	20	0,097

Uji berikutnya adalah uji homogenitas data dengan menggunakan *Levene Test*. Uji homogenitas data dilakukan untuk mengetahui sama tidaknya variasi

data kelompok sampel penelitian. Hasil uji homogenitas data akan menunjukkan data homogen apabila nilai signifikansi $p > 0,05$. Pada Tabel 4.3 tersebut menunjukkan bahwa nilai signifikansi uji homogenitas data hasil pengukuran sebesar 0,097 yang berarti menunjukkan bahwa data homogen. Kedua uji asumsi telah dilakukan dan menunjukkan hasil bahwa data berdistribusi normal dan homogen, sehingga dilanjutkan dengan uji statistik parametrik berupa uji *One-Way ANOVA*. Hasil uji *One-Way ANOVA* dapat diinterpretasikan sebagai data yang memiliki perbedaan yang signifikan apabila memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$.

Tabel 4.4 Hasil uji *One-Way ANOVA*

Uji Statistik	Sig.
One - Way ANOVA	0,000

Uji statistik yang digunakan yaitu uji parametrik *One-Way ANOVA*. Uji ini digunakan untuk menguji seluruh data sampel kelompok penelitian memiliki perbedaan rata rata yang signifikan. Berdasarkan Tabel 4.4, data hasil kelompok penelitian memiliki nilai signifikansi 0,000 yang berarti seluruh kelompok memiliki perbedaan daya hambat yang signifikan karena nilai signifikan kurang dari $p < 0,05$. Sehingga dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui hubungan antar kelompok sampel penelitian memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil uji *Post Hoc LSD* dapat diinterpretasikan terdapat perbedaan yang signifikan apabila memiliki nilai signifikan $p < 0,05$ dan sebaliknya tidak terdapat perbedaan yang signifikan apabila memiliki nilai signifikan $p > 0,05$.

Tabel 4.5 Hasil uji *Post Hoc LSD*

Kelompok Sampel	K+	K-	50%	75%	100%
K+	-	0,000*	0,001*	0,257	0,803
K-		-	0,000*	0,000*	0,000*
50%			-	0,010*	0,000*

75%	-	0,171
100%		-

* : Terdapat perbedaan yang signifikan

Keterangan :

K+ = Kontrol Positif (Klorheksidin 0,2%)

K- = Kontrol Negatif (Akuades Steril)

50% = Ekstrak daun pegagan konsentrasi 50%

75% = Ekstrak daun pegagan konsentrasi 75%

100% = Ekstrak daun pegagan konsentrasi 100%

Hasil uji *Post Hoc* LSD menunjukkan nilai signifikansi antara K+ dan K- sebesar 0,000, K+ dengan 50% sebesar 0,001, K- dengan 50% sebesar 0,000, 75% dengan K- sebesar 0,000, 75% dengan 50% sebesar 0,010, 100% dengan K- sebesar 0,000, dan 100% dengan 50% sebesar 0,000. Seluruh hasil tersebut menunjukkan nilai signifikansi dibawah 0,05 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa seluruh hubungan antara kelompok tersebut terdapat perbedaan yang signifikan. Sedangkan pada kelompok 75% dengan K+ memiliki nilai signifikan 0,257, kelompok 100% dengan K+ bernilai 0,803, dan kelompok 100% dengan kelompok 75% bernilai 0,171. Sehingga hubungan antar ketiga kelompok tersebut dapat disimpulkan memiliki nilai signifikansi diatas 0,05 ($p > 0,05$) yang berarti bahwa tidak memiliki perbedaan yang signifikan diantara ketiga kelompok tersebut.

4.3 Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi untuk meneliti uji antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus*. Penelitian uji antibakteri menggunakan metode *disk diffusion Kirby Bauer* sesuai dengan prosedur CLSI dengan melihat zona hambat yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang ditetesi bahan antibakteri (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012). Prosedur tersebut memiliki beberapa keuntungan yaitu kemudahan dalam melakukan penelitian dari segi alat dan bahan, prosedur penelitian, serta kemudahan interpretasi hasil yang terbentuk. Selain itu, metode ini dipilih karena merupakan metode standar dalam penelitian antibakteri (Balouiri *et al.*, 2016).

Penelitian ini menggunakan ekstrak pegagan yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Metode maserasi dipilih karena metode yang sederhana, ekonomis, serta dapat menggunakan alat sederhana, dan dapat meminimalisir terjadinya kerusakan kandungan metabolit sekunder akibat pemanasan terutama pada senyawa yang tidak tahan panas. Pelarut etanol 96% dipilih karena merupakan pelarut polar yang dapat melarutkan berbagai jenis kandungan senyawa metabolit sekunder sehingga dapat tersari lebih banyak. Selain itu, etanol dipilih karena kemudahan akses, netral, dan tidak toksik.

Penelitian ini menggunakan tanaman pegagan oleh karena keragaman manfaat, seperti keperluan pangan (sayuran), pengobatan, kosmetik, dan farmasi. Selain itu, tanaman ini mudah didapat dan memiliki persentase kebutuhan yang cukup tinggi di Indonesia mencapai 126 ton pertahun. Penelitian ini menggunakan daun dari tanaman pegagan karena memiliki kemampuan antibakteri yang lebih efektif dibandingkan dengan bagian lainnya. Hal ini dibuktikan dari penelitian yang dilakukan oleh Vaddadi *et al.* (2017) menunjukkan bahwa konsentrasi senyawa metabolit sekunder terbesar berada pada ekstrak daun dibandingkan ekstrak bagian lain seperti akar dan batang dari tanaman pegagan.

Kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan klorheksidin 0,2%. Klorheksidin 0,2% merupakan bahan antibakteri yang efektif dalam menghambat dan membunuh bakteri. Hal ini disebabkan oleh karena klorheksidin merupakan sebuah sediaan tunggal yang bersifat bakteristatik dan bakterisidal pada konsentrasi tertentu. Klorheksidin memiliki muatan kation (+) sedangkan bakteri memiliki muatan anion (-), sehingga hal ini yang dapat mempermudah klorheksidin untuk menempel pada bakteri dan menyebabkan rusaknya integritas dinding sel dan memperluas permeabilitas sel sehingga terjadi kebocoran sel bakteri (Rosidah *et al.*, 2014; Szymańska *et al.*, 2014; Khairiah *et al.*, 2020). Selain itu, kemampuan hambat minimum klorheksidin terhadap *L. acidophilus* adalah sebesar 0,5 mg/ml (Haghoo *et al.*, 2017). Sedangkan kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan akuades karena akuades bersifat netral (Sidharta *et al.*, 2021). Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya zona hambat di sekeliling kertas cakram yang sudah ditetesi akuades, sehingga hal ini dapat disimpulkan

bahwa akuades yang digunakan dalam kondisi steril. Selain itu, akuades steril aman digunakan sebagai pelarut pada pengencer konsentrasi ekstrak daun pegagan (Henaulu dan Kaihena, 2020).

Pengamatan hasil penelitian dapat dilakukan dalam dua keadaan, yaitu apabila zona yang terbentuk berwarna jernih maka *plate petridish* dapat diletakkan di suatu alas berlatar hitam atau gelap untuk melihat zona hambatan. Sedangkan apabila pada suatu keadaan sulit membedakan zona jernih dengan koloni bakteri secara visual, dapat dilakukan di depan lampu sorot secara langsung atau mencari daerah dengan intensitas cahaya yang cukup baik dan sudut yang tepat (Bhattacharjee, 2015). Pada pengamatan hasil penelitian dilakukan di bawah sinar matahari langsung, hal ini disebabkan oleh karena terdapat kesulitan untuk menentukan tepi zona hambat pada petridish karena terdapat difusi warna hijau dari ekstrak di sekeliling *paper disk*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 50%, 75%, dan 100% dari ekstrak daun pegagan memiliki kemampuan antibakteri terhadap *L. acidophilus* seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.1. Hasil penelitian dihitung dan diamati dengan melihat zona hambat yang jernih dan bening serta tidak terdapat koloni bakteri yang menandakan telah terbentuk hambatan dari bahan antibakteri (CLSI, 2012). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan termasuk ke dalam tanaman alami yang berpotensi memiliki kemampuan antibakteri secara baik pada bakteri Gram positif (Yunita dan Sari, 2020). Hasil rerata diameter zona hambat pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0,2% sebesar 10,98 mm dan kelompok kontrol negatif tidak menunjukkan aktivitas antibakteri sehingga bernilai 0 mm. Sedangkan hasil penelitian pada kelompok perlakuan 1 (50%) sebesar 8,80 mm, kelompok perlakuan 2 (75%) sebesar 10,35 mm, dan kelompok perlakuan 3 (100%) sebesar 11,12 mm. Menurut Davis dan Stout (1971) menjelaskan bahwa diameter zona hambat yang menunjukkan kemampuan aktivitas antibakteri dibagi menjadi 4 kategori. Kategori tersebut antara lain, yaitu kategori sangat kuat dengan diameter lebih dari 20 mm, kategori kuat dengan diameter 10-20 mm, kategori sedang dengan diameter 5-10 mm, dan kategori lemah dengan diameter kurang dari 5 mm. Berdasarkan pengamatan yang telah

dilakukan, kemampuan antibakteri pada kelompok 1 (50%) termasuk ke dalam kategori sedang, kelompok 2 (75%) termasuk kategori kuat, kelompok 3 (100%) termasuk kategori kuat, dan kontrol positif (klorheksidin 50 μ L) termasuk kategori kuat.

Berdasarkan hasil penelitian rerata diameter zona hambat pada Tabel 4.1, dapat disimpulkan bahwa seiring kenaikan konsentrasi ekstrak daun pegagan yang digunakan dalam penelitian menunjukkan adanya kenaikan rerata diameter zona hambat. Meskipun berdasarkan uji *Post Hoc LSD*, menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% dengan konsentrasi 100%, hal tersebut tetap menunjukkan adanya kecenderungan kenaikan rerata diameter zona hambat yang terbentuk dari konsentrasi 75% ke konsentrasi 100%. Hal ini disebabkan oleh adanya peningkatan jumlah kandungan senyawa metabolit di dalamnya, sehingga hal ini memudahkan terjadinya penetrasi senyawa metabolit ekstrak tersebut yang dapat menyebabkan rusaknya sistem metabolisme dan fungsi sel bakteri. Hasil pada penelitian ini menunjukkan adanya "*dose relation effect*" yang sejalan dengan penelitian Widiastuti *et al.* (2017) yang menyimpulkan bahwa dengan adanya peningkatan dosis atau konsentrasi pada ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) terbukti meningkatkan kemampuan aktivitas antibakteri.

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc LSD* antara kelompok klorheksidin 0,2% dengan ekstrak daun pegagan konsentrasi 75%, kelompok klorheksidin 0,2% dengan ekstrak daun pegagan konsentrasi 100%, serta ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% dengan konsentrasi 100% menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Hal tersebut dapat diartikan bahwa antarkelompok tersebut memiliki kemampuan efek antibakteri yang setara atau hampir sama. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% dan 100% setara dengan klorheksidin 0,2% sebagai antibakteri terhadap *L. acidophilus*.

Kemampuan antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap *L. acidophilus* yang telah terbukti dalam penelitian ini diduga disebabkan oleh kandungan fitokimia senyawa metabolit sekunder di dalamnya yaitu antara lain flavonoid, tannin, saponin, steroid, terpenoid, dan alkaloid. Persentase kandungan fitokimia

tersebut dapat dipengaruhi oleh faktor internal berupa gen tanaman dan faktor eksternal berupa ketinggian tempat, cahaya, suhu, kelembapan, pH, dan unsur hara tanah (Katuuk *et al.*, 2019).

Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri dibagi menjadi 3 bagian yaitu dengan dengan menghentikan sintesis DNA dan RNA sehingga dapat menghambat terbentuknya asam nukleat bakteri (Ulanowska *et al.*, 2006), menghambat fungsi membran sel bakteri dengan melepaskan kalium pada dinding sel, sehingga menyebabkan kerusakan langsung pada dinding sel bakteri (Cushnie dan Lamb, 2005), serta menghambat metabolisme energi bakteri dengan cara mengubah membran luar dan sitoplasma sel, sehingga mengganggu pertukaran nutrisi dan metabolit sel dan akhirnya menghambat pasokan energi untuk kehidupan bakteri (Eumkeb dan Chunkrathok, 2013). Mekanisme tannin sebagai antibakteri adalah dengan berikatan dengan peptidoglikan dinding sel dan mengganggu integritas sel untuk fungsi antibakteri sehingga dapat menghambat formasi atau pembentukan biofilm pada bakteri (Dong *et al.*, 2018). Mekanisme saponin sebagai antibakteri adalah mendenaturasi protein membran sel bakteri hingga lisis, menghancurkan permeabilitas dinding sel bakteri, serta memodifikasi lipid membran sel sehingga bakteri sulit berinteraksi sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk mematikan bakteri (Johnson, 2013).

Mekanisme steroid sebagai antibakteri adalah dengan mengakibatkan kebocoran lisosom serta berinteraksi dengan fosfolipid sehingga integritas membran bakteri turun dan sel bakteri menjadi rapuh (Epanand *et al.*, 2007). Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah dengan bereaksi bersama protein transmembran pada dinding sel bakteri, kemudian membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga dapat mendenaturasikan porin di membran tempat keluar masuknya senyawa sehingga permeabilitas sel turun dan bakteri kekurangan asupan nutrisi dan bakteri menjadi mati (Cowan, 1999). Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah berikatan dengan membran fosfolipid dan kelompok fosfat (komponen asam nukleat) sehingga menyebabkan kebocoran komponen intraseluler bakteri. Hal tersebut dapat menurunkan integritas struktur membran sel yang dapat memicu kematian bakteri (Li *et al.*, 2014).

Kemampuan antibakteri secara umum juga dipengaruhi oleh kemampuan difusi bahan antibakteri ke dalam *paper disk* dan ke media agar, serta kecepatan tumbuh dan tingkat kesensitifitasan bakteri uji terhadap bahan antibakteri yang bersangkutan. Berdasarkan Kanazawa *et al.*, (1995) dalam Wilapangga (2018), interaksi kepolaritasan bahan antibakteri dengan sel bakteri memerlukan adanya keseimbangan hidrofilik-lipofilik. Hal ini sependapat dengan prinsip *like dissolves like* dalam Malindo (2015) yang berarti bahwa senyawa polar akan mudah larut dengan senyawa polar, begitu pula sebaliknya. Hal ini berkaitan dengan struktur dan morfologi bakteri *L. acidophilus* yang merupakan bakteri Gram positif yang memiliki tiga lapis sitoplasma, dengan lapisan dinding sel berupa lipid peptidoglikan yang sangat tebal, mengandung polisakarida berupa asam teikoat dan bersifat polar. Sehingga hal ini yang diduga memunculkan adanya kemudahan suatu kandungan senyawa metabolit sekunder daun pegagan untuk berdifusi ke dalam bakteri *L. acidophilus* sehingga dapat terjadi efek antibakteri.

Hasil penelitian yang tampak pada Gambar 4.1, menunjukkan bahwa terdapat warna hijau yang jernih dan tidak terdapat bakteri di dalamnya, serta secara visual tampak adanya perbedaan gradasi warna hijau yang terbentuk. Kemunculan warna tersebut diduga disebabkan oleh karena terjadinya difusi warna alami ekstrak yang terserap ke dalam *paper disk*. Hal ini diduga disebabkan oleh kandungan zat aktif flavonoid dan tannin pada ekstrak daun pegagan yang berfungsi sebagai pigmen warna dan zat antibakteri (Sutardi, 2016). Pigmen warna tersebut juga dapat disebabkan oleh adanya kandungan klorofil dalam ekstrak daun pegagan (Setiari dan Nurchayati, 2009).

Konsentrasi ekstrak daun pegagan yang semakin tinggi menunjukkan pigmentasi warna hijau yang semakin pekat. Setiap kelompok perlakuan mengalami gradasi warna hijau dari tepi *paper disk* yang semakin menunjukkan warna hijau lebih cerah ke tepi zona hambat. Hal ini sejalan dengan penelitian Safitri *et al.* (2021) yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun pegagan yang digunakan akan semakin tinggi kandungan klorofil di dalamnya. Kandungan klorofil ini akan mempengaruhi tingkat kecerahan yang akan muncul (Wahyuni dan Wijanarko, 2015). Sehingga perlu diperhatikan

mengenai pertimbangan warna yang timbul dari ekstrak daun pegagan terhadap pembuatan bahan antibakteri pada penelitian berikutnya, karena berkaitan dengan estetika gigi.

Berdasarkan uraian hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 50%, 75% dan 100% memiliki kemampuan daya hambat antibakteri terhadap *L. acidophilus*. Walaupun secara statistik menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan, pada hasil penelitian menunjukkan bahwa seiring kenaikan konsentrasi ekstrak daun pegagan yang diuji terbukti memiliki kecenderungan kenaikan diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% dan konsentrasi 100% memiliki kemampuan antibakteri yang setara dengan klorheksidin 0,2%. Hal ini memerlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemampuan toksisitas, biokompatibilitas ekstrak, dan uji fitokimia lebih lanjut untuk mengetahui kandungan zat kimia yang paling berperan dalam efek antibakteri dari ekstrak daun pegagan.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak daun pegagan (*C.asiatica*) dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% terbukti memiliki kemampuan antibakteri terhadap *L. acidophilus*.
2. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) maka semakin besar potensi antibakteri terhadap *L.acidophilus*.
3. Ekstrak daun pegagan konsentrasi 75% dan 100% memiliki kemampuan antibakteri yang setara dengan klorheksidin 0,2% sebagai kontrol positif terhadap *L. acidophilus*.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut mengenai senyawa metabolit spesifik yang berperan sebagai antibakteri pada ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*).
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai uji antibakteri ekstrak daun pegagan terhadap bakteri lain.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai konsentrasi hambat yang tidak memunculkan difusi warna hijau pada zona hambat dengan tujuan terkait estetika gigi pada aplikasi ekstrak daun pegagan di masa depan.
4. Perlu dilakukan uji biokompatibilitas, toksisitas, dan efektivitas kemampuan antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*).
5. Perlu dilakukan penelitian mengenai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*).
6. Perlu dilakukan penelitian mengenai kemampuan antibakteri ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agneeswari, S., S. Amutha, dan J. J. A. Jenishini. 2019. Characterization and antimicrobial activity of *Centella asiatica*. *International Journal of Engineering and Advanced Technology (IJEAT)*. 9(1S6): 125-131.
- Ahirwar, S. S., M. K. Gupta, dan S. K. Snehi. 2019. Dental caries and *Lactobacillus*: role and ecology in the oral cavity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 10(11): 4818-4829.
- Ahirwar, S.S., M.K. Gupta, G. Gupta, dan V. Singh. 2017. Screening, isolation and identification of *Lactobacillus* species from dental caries of children. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*.6(1): 497-503.
- Anjum N., S. Maqsood, T. Masud, A. Ahmad, dan A. Momin. 2014. *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54(9): 1241-1251.
- Azzahra, F. dan M. Hayati. 2018. Uji aktivitas ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L). Urb) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal B-Dent*. 5(1): 9 – 19.
- Badet C. dan N. B. Thebaud. 2008. Ecology of *Lactobacilli* in the oral cavity: a review of literature. *The Open Microbiology Journal*. 2: 38-48.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibnsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2016): 71-79.
- Bermawie, N., S. Purwiyanti, dan Mardiana. 2008. Keragaman sifat morfologi, hasil dan mutu plasma nutfah pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Bul Littro*. XIX(1): 1-17.

- Bhattacharjee, Mrinal K. 2015. Better visualization and photodocumentation of zone of inhibition by staining cells and background agar differently. *The Journal of Antibiotics*. 68(10): 657-659.
- Brookes, Z.L.S., R. Bescos, L.A. Belfield, K. Ali, dan A. Roberts. 2020. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease:a narrative review. *Journal of Dentistry*. 103(2020): 1-9.
- Chairunnisa, S., N. M. Wartini, dan L. Suhendra. 2019. Pengaruh suhu dan waktu maserasi terhadap karakteristik ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana* L.) sebagai sumber saponin. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*.7(4): 551-560.
- Chandrasekara, C. H. W. M. R. B., R. A. P. I. Sumanarathne, dan P. C. G. Bandaranayake. 2020. *Centella asiatica* morphotypes differ genetically as well as macronutrients content, total phenolic content and chemical fingerprints of leaves. *The Jurnal of Agricultural Sciences Sri Lanka*. 15(1): 75-87.
- Clinical and Laboratories Standards Institute. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests:Approved Standard-Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 9-13.
- Clinical and Laboratories Standards Institute. 2015. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria*. CLSI document M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 38-39.
- Cowan, Murphy Marjorie. 1999. *Plant products as antimicrobial agents*. Washington DC: American Society for Microbiology. 12(4): 564-582.
- Cushnie, T. P. T., dan A. J. Lamb. 2005. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*. 101(2005): 243 - 248.
- Davis and Stout. 1971. Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Essay. *Journal Of Microbiology*. 22(4).

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- Djoko, W., S. Taurhesia, R. Djamil, dan P. Simanjuntak. 2020. Standarisasi ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica*). *Saintech Farma Jurnal Ilmu Kefarmasian*. 13(2): 59-64.
- Dong, G., H. Liu, X. Yu, X. Zhang, T. Zhou, dan J. Cao. 2018. Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*. 32(18): 2225-2228.
- Endarini, Lully Hanni. 2016. *Farmakognisi dan Fitokimia*. Cetakan Pertama. Jakarta Selatan: Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Eband, Raquel F., P. B. Savage, dan R. M. Eband. 2007. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (ceragenins). *Biochimica et Biophysica Acta*. 1768(2007): 2500-2509.
- Eumkeb, G. dan S. Chukrathok. 2013. Synergistic activity and mechanism of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine*. 20(2013): 262-269.
- Federer, Walter T. 1967. *Experimental Design, Theory and Application*. New Delhi: Mac Millan.
- Ferraro, M. dan A. R. Vieira. 2010. Explaining gender differences in caries: a multifactorial approach to a multifactorial disease. *International Journal of Dentistry*. 10: 1-5.
- Fitriana, Y. A. N., V. A. N. Fatimah, dan A. S. Fitri. 2019. Aktivitas anti bakteri daun sirih: uji ekstrak khm (kadar hambat minimum) dan kbm (kadar bakterisidal minimum). *Sainteks*. 16(2): 101 – 108.
- Haghgoo, R., M. Mehran, H. F. Zadeh, E. Afshari, dan N. F. Zadeh. 2017. Comparison between antibacterial effect of chlorhexidine 0,2% and different concentrations of *Cyperus rotundus* extract : an in vitro study.

2017 *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. 7(5): 242-246.

Hakim, R. F., Fakhrurazi, A. Editia. 2018. Pengaruh air perasan jeruk nipis (*Citrus Aurantifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*. 3(1): 1-5.

Hamid, Kaiser. 2015. Investigation of the Chemical Constituents of Some Medicinal Plants Acting in Different GABAA Receptor Subtypes. *Disertasi*. Sydney : Faculty of Pharmacy. The University of Sydney.

Handayani, F., H. Warnida, dan S. J. Nur. 2016. Formulasi dan uji aktivitas antibakteri *Streptococcus mutans* dari sediaan mouthwash ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). *Media Sains*. 9(1): 74-84.

Haryati, S. D., S. Darmawati, dan W. Wilson. 2017. Perbandingan Efek Ekstrak Buah Alpukat (*Persea Americana Mill*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* dengan Metode Disk dan Sumuran. *Prosiding Seminar Nasional Publikasi Hasil-Hasil Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*. 30 September 2017. Universitas Muhammadiyah Semarang: 348-352.

Hayati, Z., N. Hafdhah, dan Junaidi. 2013. The Effect of Ethanol Extracts of Pegagan (*Centella asiatica*) Urban in Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and *Kleibsiella pneumoniae* that Caused Pneumonia. *Proceedings of The 3rd Annual International Cingerrncr Syiah Kuala University (AIC Unsyiah) 2013 In conjunction with the 2nd International Conference on Multidisciplinary Reseach (ICMR)* 3(3). 2-4 Oktober 2013. Syiah Kuala University: 66-71.

Henaulu, A. H. dan M. Kaihena. 2020. Potensi antibakteri ekstrak etanol daun kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC) terhadap pertumbuhan *Escheriscia coli* dan *Staphylococcus aureus* in vitro. *Biofaal Journal*. 1(1): 44-54.

Hidayat, Habibi. 2015. Identifikasi morfologi dan uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* dari fermentasi buah markisa (*Passiflora sp.*). *Eksakta: Journal of Sciences and Data Analysis*. 15(1-2): 76-85.

- Hudzicki, Janet. 2016. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Idris, F. N. dan M. M. Nadzir. 2021. Comparative studies on different extraction methods of *Centella asiatica* and extracts bioactive compounds effects on antimicrobial activities. *Journal Antibiotics*. 10(457): 1-24.
- Irmawartini dan Nurhaedah. 2017. *Bahan Ajar Kesehatan Lingkungan 'Metodologi Penelitian'*. Cetakan Pertama. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia: Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Johnson, Moric Alisa. 2013. Saponins as agents preventing infection caused by common waterborne pathogens. *Thesis*. Arlington: Requirement for the degree of Doctor of Philoshophy. The University of Texas at Arlington.
- Julianto, Tatang Shabur. 2019. *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Cetakan I. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.
- Juliantoni, Y. dan D. G. Wirasisya. 2018. Optimasi formula obat kumur ekstrak herba ashitaba (*Angelica keiskei*) sebagai antibakteri karies gigi. *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*. 6(1): 40-44.
- Kanazawa, A., Ikeda T., dan Endo T. 1995. A novel approach to mode of action of cationic biocides morfological effect on bacterial activity. *J. Appli. Bacteriol.* 78: 55-60.
- Karim, Z., R. Sulistijowati, dan N. Yusuf. 2018. Aktivitas antibakteri ekstrak flavonoid buah mangrove *Sonneratia alba* terhadap bakteri *Vibrio alginolitycus*. *Nikè: Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 6(2): 55 - 60.
- Karpinska, S. A. dan A. Szakaradkiewicz. 2021. Effect of exopolysaccharides from cariogenic bacteria on human gingival fibroblasts. *International Journal of Medical Sciences*. 18(12): 2666-2672.
- Katuuk, R. H. H., S. A. Wanget, dan P. Tumewu. 2019. *Pengaruh perbedaan ketinggian tempat terhadap kandungan metabolit sekundet pada gulma*

babadotan (Ageratum conyzoides L.). Universitas Sam Ratulangi Manado 2018.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. *Laporan Nasional Riskesdas 2018*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

Khairiah, S., B. W. Oktiani, dan D. K. T. Putri. 2020. Efektivitas antibakteri ekstrak daun kasturi (*Mangifera casturi*) terhadap pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *Dentin Jurnal Kedokteran Gigi*. IV(3): 88-94.

Kurniawati, A., L. K. Darusman, dan R. Y. Rachmawaty. 2005. Pertumbuhan, produksi, dan kandungan triterpenoid dua jenis pegagan (*Centella asiatica* L. (Urban)) sebagai bahan obat pada berbagai tingkat naungan. *Bul. Agron*. 33(3): 62-67.

Kusumawardani, B. dan D. M. C. Robin. 2019. *Penyakit Dentomaksilofasial*. Cetakan Pertama. Malang: Intimedia.

Larijani, K. S., A. A. Moghadamnia, A. B. Makrani, M. A. H. Tabari, M. Sepidarkish, dan E. Khodadadi. 2021. Antimicrobial activity of Carvacrol against *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*, an in vitro study. *Journal of Research In Applied and Basic Medical Sciences*. 7(4): 172-178.

Li, N., S. Tan, J. Cui, N. Guo, W. Wang, Y. Zu, S. Jin, X. Xu, Q. Liu, dan Y. Fu. 2014. PA-1, a novel synthesized pyrrolizidine alkaloid inhibits the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane. *The Journal of Antibiotics*. 2014(67): 689-696.

Listrianah, R.A. Zainur, dan L. S. Hisata. 2018. Gambaran karies gigi molar pertama permanen pada siswa – siswi sekolah dasar negeri 13 Palembang tahun 2018. *JPP (Jurnal Kesehatan Poltekkes Palembang)*. 13(2): 136-149.

- Listriana. 2017. Indeks karies gigi ditinjau dari penyakit umum dan sekresi saliva pada anak di sekolah dasar negeri 30 Palembang 2017. *JPP (Jurnal Kesehatan Palembang)*.12(2): 136-148.
- Malindo, Yohanes. 2015. Uji aktivitas antibakteri infusa daun mangga bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Mahasiswa PSPS FK Universitas Tanjungpura*. 3(1): 1-18.
- Mansur, D. S., M. N. Hidayat, dan Irmawaty. 2019. Ketahanan bakteri asam laktat asal saluran pencernaan broiler terhadap ph dan garam empedu. *Jurnal Ilmu dan Industri Peternakan*. 5(1): 27-37.
- Martono, Budi. 2011. Keragaman dan Tanggap Pertumbuhan serta Produksi Asiatikosida Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) pada Ketinggian Tempat dan Naungan yang Berbeda. *Disertasi*. Bogor : Program Studi Agronomi. Institut Pertanian Bogor.
- Maruzy, A., M. Budiarti, dan D. Subositi. 2020. Autentifikasi *Centella asiatica* (L.) Urb. (pegagan) dan adulterannya berdasarkan karakter makroskopis, mikroskopis, dan profil kimia. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 10(1): 19-30.
- Mirawati, Ellis. 2017. Efektivitas obat kumur yang mengandung cengkeh dan chlorhexidine gluconat 0,2 % dalam pencegahan pembentukan plak. *Media Kesehatan Gigi*. 16(2): 34-39.
- Muhajirin dan M. Panorama. 2017. *Pendekatan Praktis Metode Penelitian Kualitatif dan Kuantitatif*. Cetakan 1. Yogyakarta: Idea Press Yogyakarta.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*. VII(2): 361-367.
- Musyarofah, N., S. Susanto, S. A. Aziz, S. Kartosoewarno. 2007. Respon tanaman pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) terhadap pemberian pupuk alami di bawah naungan. *Bul. Agron*. 35(3): 217-224.

- Nurhalisa, S., E. S. Lestari, G. Wibisono, D. A. Indraswari. 2020. The influence of various concentrated cherry (*Muntingia Calabura*) extract in preventing *Lactobacillus acidophilus* in vitro. *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*. 9(6): 429-435.
- Nurhayati, L. S., N. Yahdiyani, dan A. Hidayatulloh. 2020. Perbandingan pengujian aktivitas antibakteri starter yogurt dengan metode difusi sumuran dan metode difusi cakram. *Jurnal teknologi Hasil Peternakan*, 1(2): 41-46.
- Pitts, N. B., D. T. Zero, P. D. Marsh, K. Ekstrand, J. A. Weintraub, F. Ramos-Gomez, J. Tagami, S. Twetman, G. Tsakos, dan A. Ismail. 2017. Dental caries. *Macmillan Publisher Limited, part of Springer Nature*. 3:1-16.
- Putri, M. H., Sukini, dan Yodong. 2017. *Mikrobiologi*. Cetakan Pertama. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Putri S, Felicita Eka. 2019. Aktivitas penghambatan pembentukan biofilm ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Pyar, H. dan K.K. Peh. 2014. Characterization and identification of *Lactobacillus achidophilus* using biolog rapid identification system. *International Journal of Pharmacy and Pharmacheutical Sciences*. 6(1): 189-193.
- Rahmaniati, A., M. Ulfah, dan D. A. K. Mulangsari. 2018. Standarisasi parameter non spesifik ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica* L.) di dua tempat tumbuh. *Inovasi Teknik Kimia*. 3(1): 67-71.
- Ramandey, J. M. dan P. Bunei. 2021. Identifikasi tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.) sebagai tanaman obat bagi masyarakat suku Mee di distrik Tigi Timur kabupaten Deiyai. *Jurnal Pertanian dan Peternakan*. 6(1): 1-9.
- Rasyidah dan R. Fariani. 2021. Perbandingan teknik penyimpanan menggunakan medium yang berbeda terhadap viabilitas kuman *Colletotrichum capsici* dan *Prycularia oryzae*. *Jurnal Pengelolaan Laboratorium Pendidikan*. 3(2): 69-76.

- Ratih, I. A. D. K. dan N. L. P. S. I. Dewi. 2019. Hubungan perilaku makan permen dengan karies pada siswa SDN 1 Dawan Kaler Kabupaten Klungkung Tahun 2017. *Jurnal Kesehatan Gigi (Dental Health Journal)*.6(2): 1-4.
- Razali, N. M. dan Y. B. Wah. 2011. Power comparisons of saphiro wilk, kolmogorov smirnov, lilliefors and anderson darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analysis*. 2(1): 21-33.
- Retnaningsih, A., A. Primadhamanti, dan I. Marisa.2019. Uji daya hambat ekstrak etanol biji pepaya terhadap bakteri *Escherichia Coli* dan *Shigella dysentriae* dengan metode difusi sumuran. *Jurnal Analis Farmasi*. 4(2): 122 - 129.
- Rosidah, A. N., P. E. Lestari, dan P. Astuti. 2014. Daya antibakteri ekstrak daun kendali (*Hippobroma longiflora* [L] G. Don) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal Pustaka Kesehatan*: 1-7.
- Safitri, Y. A., U. Rohajatien, dan L. Hidayati. 2021. Pengaruh penggunaan konsentrasi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) terhadap sifat fisik dan kapasitas antioksidan mochi ice cream. *Jurnal Inovasi Teknik dan Edukasi Teknologi*. 1(5): 344-350.
- Saima, S. dan R. Ahmad. 2019. Efficacy of chlorhexidine vs herbal mouthwash in college students: a comparative study. *International Journal of Applied Dental Sciences*2019. 5(2): 403-406.
- Salim, Z. dan E. Munadi. 2017. *Info Komoditi Tanaman Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Badan Pengkajian dan Pengembangan Perdagangan.
- Samaranayake, Lakshman. 2018. *Essential Microbiology for Dentistry*. Fifth Edition. London: Elsevier Limited.
- Saridewi, M. N., M. Bahar, Anisah. 2017. Uji efektivitas antibakteri perasan jus buah nanas (*Ananas comosus*) terhadap pertumbuhan isolat bakteri plak gigi di Puskesmas Kecamatan Tanah Abang periode April 2017. *Jurnal Biogenesis*. 5(2): 104-110.

- Senthilkumar, Mariappan. 2018. Investigation on Quantification of Bioactive Compounds and In Vitro Antibacterial Property of Important Medical Plant of *Centella asiatica* (L.) Urban. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3(1): 127-132.
- Setiani, N. N., I. G. K. Adiputra, dan I. Sitepu. 2020. Daya hambat ekstrak buah jeruk nipis terhadap bakteri *Streptococcus mutans* penyebab karies gigi. *Widya Biologi*. 11(02): 217-226.
- Setiari, N. dan Y. Nurchayati, 2009. Eksplorasi kandungan klorofil pada beberapa sayuran hijau sebagai alternatif bahan dasar makanan tumbuhan. *BIOMA*. 11(1): 6-10.
- Sidharta, R., Santi, A. N., Sutanti, V., dan Diah, D. 2021. Efektivitas ekstrak daun eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) terhadap viabilitas *Porphyromonas gingivalis* secara in vitro. *E-Prodenta Journal of Dentistry*. 5(1): 403-413.
- Sivapathasundharam, B. 2020. *Shafer's Textbook of Oral Pathology*. Ninth Edition. New Delhi: Elsevier Ltd.
- Smith, A.C. dan M. A. Hussey. 2016. *Gram Stain Protocols*. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Susetyarini, E. dan E. Nurrohman. 2022. Fitokimia ekstrak dan rebusan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) langkah awal mencari senyawa potensial kandidat immunomodulator. *Jurnal Sains Riset (JSR)*. 12(1): 51-58.
- Susetyarini, E., R. Latifa, P. Wahyono, dan E. Nurrohman. 2020. *Atlas Morfologi dan Anatomi Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban.)*. Malang : Universitas Muhammadiyah Malang.
- Sutardi. 2016. Kandungan bahan aktif tanaman pegagan dan khasiatnya untuk meningkatkan sistem imun tubuh. *Jurnal Litbang Pertanian*. 35(3): 121-130.

- Swarjana, I Ketut. 2015. *Metodologi Penelitian Kesehatan [Edisi Revisi]*. Yogyakarta: Andi: 68-72.
- Szymanska, M. L., J. Sokolowski, dan B. Lapinska. 2017. Chlorhexidine mechanism of action and its application to dentistry. *Journal Stoma*. 70(4): 405-417.
- Tenda, P. E., M.Y. Lenggu, dan M.S. Ngale. 2017. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit pohon falok (*Sterculia sp.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Info Kesehatan*.15(1): 227-239.
- Timotius, Kris H. 2017. *Pengantar metodologi penelitian: Pendekatan manajemen pengetahuan untuk perkembangan pengetahuan*. Yogyakarta: Andi: 14.
- Tirta, L. P. P. dan A. A. G. R. Y. Putra. 2020. A narrative review of apiaceae family plants in usada netra for eye disease treatment. *Jurnal of Pharmaceutical Science and Application*. 2(2): 49-65.
- Ulanowska, K., A. Tkaczyk, G. Konopa, dan G. Wegrzyn. 2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA, and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch Microbiol*. 2006(184): 271-278.
- Utami, Fauziah. 2013. Pengaruh suhu terhadap daya probiotik hidup bakteri pada sediaan probiotik. *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan.
- Vaddadi, S., P. Agrawal, A. Das, D. Kotagiri, dan V. C. Kolluru. 2017. Antimicrobial and antioxidant activities in the root, stem, and leaf extracts of *Centella asiatica*. *Advances in Biotechnology and Microbiology*. 3(4): 555618.
- Vadlapudi, V., M. Behara, D. S. V. G. K. Kaladhar, S. V. N. S. Kumar, B. Seshagiri, dan M. J. Paul. 2012. Antimicrobial profile of crude extracts *Calotropis procera* and *Centella asiatica* against some important pathogens. *Indian Journal of Science and Technology*. 5(8): 3132-3136.

- Wahyuni, D. T. dan S. B. Widjanarko. 2015. Pengaruh jenis pelarut dan lama ekstraksi terhadap ekstrak karotenoid labu kuning dan metode gelombang ultrasonik. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(2): 390-401.
- Wardinal, Safika, dan Y. S. Ismail. 2019. Identifikasi *Lactobacillus Sp* pada orangutan sumatera (*Pongo abelii*) liar menggunakan kit api 50 chl di stasiun penelitian Suaq Belimbing Aceh Selatan. *Jurnal Biotik*. 7(1): 49-56.
- Widiastuti, Rina, F. Nurhaeni, D. L. Marfuah, dan G. S. Wibowo. 2017. Potensi antibakteri dan anticandida ekstrak etanol daun pegagan (*Centella Asiatica (L) Urb.*). *Jurnal Ilmu Kesehatan Bhakti Setya Medika*. 1(1): 1-8.
- Wilapangga, A. dan S. Syaputra. 2018. Analisis antibakteri metode agar cakram dan uji toksisitas menggunakan BSLT (brine shrimp lethality test) dari ekstrak metanol daun salam (*Eugenia Polyantha*). *IJOB*. 2(2): 50-56.
- Yusmaniar, Wardiyah, dan K. Nida. 2017. *Mikrobiologi dan Parasitologi*. Cetakan Pertama. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia : Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Yunita, E. dan D. R. A. P. Sari. 2020. Potensi antibakteri pegagan (*Centella asiatica*) terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Jurnal Emasains : Jurnal Edukasi Matematika dan Sains*. IX(2): 236-240.
- Zubaidah, N., D. E. Juniarti, F. Basalamah. 2018. Perbedaan daya antibakteri ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) 3,125% dan chlorhexidine 0,2% terhadap *Lactobacillus acidophilus*. *Conservative Dentistry Journal*. 8(1): 11-19.

LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Sertifikat *Lactobacillus acidophilus*

UNIVERSITAS GADJAH MADA
PUSAT STUDI PANGAN DAN GIZI
Alamat : Gedung PAU-UGM, Jalan Teknika Utara, Berek, Yogyakarta 55281, Phone/Fax. (0274) 589242
http://cfns.ugm.ac.id, E-mail : cfns@ugm.ac.id

SERTIFIKAT MIKROBIA
FNCC-PSPG/87/IV/2022

***Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051**

Nama mikrobia : *Lactobacillus acidophilus*
Nomor strain : FNCC 0051
Bentuk awetan : Kultur hidup pada media agar tegak
Media : MRS
Suhu inkubasi : 37°C
Patologi : Bukan pathogen

Cara pembiakan : Kultur yang tumbuh di media agar tegak (alur tusukan media agar) diambil menggunakan ose steril , kemudian diinokulasikan ke media MRS broth atau MRS agar tegak yang baru dengan cara menusukkan ke media agar tegak tersebut (bisa lebih dari satu tusukan), kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 48 jam. Setelah tumbuh kultur dapat disimpan pada suhu 4°C selama 2 minggu.

Yogyakarta, 1 April 2022
Kurator FNCC



Prof. Dr. Ir. Endang S. Rahayu, M.S.



LABORATORIUM MIKROBIOLOGI
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER

SURAT KETERANGAN

No. 0218/MIKRO/S.KET/2022

Sehubungan dengan keperluan identifikasi mikroorganisme, kami menerangkan bahwa mahasiswa berikut :

Nama : Kintan Jettanurul Maharani
NIM : 181610101099
Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi
Keperluan : Skripsi Penelitian

Telah melakukan identifikasi terhadap isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus* dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil bacillus gram positif.

Jember, 10 Mei 2022

Mengetahui,
Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

(drg. Zahara Meilawaty, M.Kes)
NIP. 198005272008122002

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi

(drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes)
NIP. 197608092005012002

Lampiran 3.2 *Ethical Clearance*

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITY OF JEMBER)</p>	
<p><u>No.1465/UN25.8/KEPK/DL/2022</u></p>	
Title of research protocol :	" The Antibacterial Test Of Centella Leaf Extract (Centella asiatica) Againts Lactobacillus acidophilus In Vitro"
Document Approved :	Research Protocol
Principal investigator :	Kintan Jettanurul Maharani
Member of research :	-
Responsible Physician :	Kintan Jettanurul Maharani
Date of approval :	Februari 2022 – selesai
Place of research :	<ol style="list-style-type: none"> 1. Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember 2. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas JemberMulut Universitas Jember 3. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember 4. Laboratorium Politeknik Negeri Jember
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry University of Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefor can be carried out.</p>	
<p>Jember, February 17th 2022</p>	
<p>Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry University of Jember</p>	
	
 <p>(Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)</p>	

Lampiran 3.3 Surat Identifikasi Daun Pegagan (*Centella asiatica*)

Kode Dokumen : FR-AUK-064 Revisi : 0
 <p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI POLITEKNIK NEGERI JEMBER UPT. PENGEMBANGAN PERTANIAN TERPADU Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531 E-mail : Polije@polije.ac.id Web Site : http://www.Polije.ac.id</p>
<u>SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN</u>
No: 07/PL17.8/PG/2022
<p>Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 008/UN25.8/PG/2022 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu, Politeknik Negeri Jember oleh:</p> <p>Nama : Kintan Jettanurul Maharani NIM : 181610101099 Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember</p> <p>maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah: <i>Kingdom: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Sub Devisio: Magnoliophyta; Kelas: Magnoliopsida; Ordo: Umbellales; Famili: Umbelliferae; Genus: Centella; Spesies: Centella asiatica, Urb</i></p> <p>Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.</p> <p style="text-align: right;">Jember, 11 Januari 2022 Ka. UPT. Pengembangan Pertanian Terpadu</p> <div style="text-align: center;">  <p>Ir. Budi Prasetyo, S.Pt, MP, IPM NIP. 197106212001121001</p> </div>

Lampiran 3.4 Surat Izin Penelitian

	KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN TEKNOLOGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121 Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991 Laman fkg.unej.ac.id; email: fkg@unej.ac.id	
	Nomor : 5767 /UN25.8/PG/2021 Perihal : Ijin Penelitian	15 DEC 2021
<p>Kepada Yth. Direktur Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember Di – Jember</p>		
<p>Dalam rangka penelitian, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami:</p>		
1	Nama	: Kintan Jettanurul Maharani
2	NIM	: 181610101099
3	Semester/Tahun Akademik	: VII – 2021/2022
4	Fakultas	: Kedokteran Gigi
5	Alamat	: Jalan Baturaden 1 No.6, Sumbersari, Jember
6	Judul Penelitian	: Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) terhadap <i>Lactobacillus acidophilus</i> Secara <i>In Vitro</i>
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Bioscience RSGM Universitas Jember
8	Data/alat yg di pinjam	: Alat ekstraksi maserasi, infusum, dan alat uji antibakteri
9	Waktu	: Desember 2021 – Januari 2022
10	Tujuan Penelitian	: Melakukan ekstraksi dengan metode maserasi ekstrak daun pegagan (<i>Centella asiatica</i>)
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Pudji Astuti, M.Kes : 2. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes
<p>Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih</p>		
		 <p>Wakil Dekan I, Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp.OF (K) NIP.196811251999032001</p>
<p>Kintan Jettanurul 1 of 1</p>		



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121
Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991
Laman fkg.unej.ac.id; email: fkg@unej.ac.id

Nomor : 008 /UN25.8/PG/2022
Perihal : Ijin Penelitian

03 JAN 2022

Kepada Yth.
Kepala UPT Pengembangan Pertanian Terpadu
Politeknik Negeri Jember
Di –
Jember

Dalam rangka penelitian, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami:

- 1 Nama : Kintan Jettanurul Maharani
- 2 NIM : 181610101099
- 3 Semester/Tahun Akademik : VII – 2021/2022
- 4 Fakultas : Kedokteran Gigi
- 5 Alamat : Jalan Baturaden 1 No.6, Sumbersari, Jember
- 6 Lokasi Penelitian : Laboratorium Tanaman Politeknik Negeri Jember
- 7 Judul Penelitian : Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap *Lactobacillus acidophilus* Secara *In Vitro*
- 8 Dosen Pembimbing : 1. drg. Pudji Astuti, M.Kes
2. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes
- 9 Tujuan Penelitian : Identifikasi Daun Pegagan (*Centella Asiatica*)
- 10 Data/alat yg di pinjam : Alat identifikasi
- 11 Waktu : Januari – Maret 2022

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an. Dekan
Wakil Dekan I,

Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp.OF (K)
NIP.196811251999032001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Jalan Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto Jember 68121
Telepon (0331) 333536, 331743 Faksimili (0331) 331991
Laman fkg.unej.ac.id; email: fkg@unej.ac.id

Nomor : **813** /UN25.8/PG/2022
Perihal : Ijin Penelitian

23 FEB 2022

Kepada Yth.
Kepala Laboratorium Biomedik Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di –
Jember

Dalam rangka penelitian, maka dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi Mahasiswa kami:

- 1 Nama : Kintan Jettanurul Maharani
- 2 NIM : 181610101099
- 3 Semester/Tahun Akademik : VIII – 2021/2022
- 4 Fakultas : Kedokteran Gigi
- 5 Alamat : Jalan Baturaden 1 No.6, Sumbersari, Jember
- 6 Lokasi Penelitian : Laboratorium Biomedik Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 7 Judul Penelitian : Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*)
terhadap *Lactobacillus acidophilus* Secara *In Vitro*
- 8 Dosen Pembimbing : 1. drg. Pudji Astuti, M.Kes
2. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes
- 9 Tujuan Penelitian : 1. Mengetahui efek antibakteri ekstrak daun pegagan
(*Centella asiatica*) terhadap *Lactobacillus acidophilus*
2. Menganalisis potensi kemampuan antibakteri seiring
peningkatan konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) 50%, 75%, dan 100% terhadap *L. acidophilus*.
3. Mengetahui perbandingan kemampuan daya hambat
konsentrasi ekstrak daun pegagan dengan
chlorheksidin.
- 10 Alat yang digunakan : Autoklaf, petridish, kertas cakram, inkubator, bunsen,
mikropipet, laminar air flow, jangka sorong, hotplate
stirrer, rak tabung reaksi, spektrofotometer, tabung reaksi,
thermolyne, vortex, kawat ose, dan beaker glass
- 11 Waktu : Februari – April 2022

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. drg. Masniari Novita, M.Kes., Sp.OF (K)
NIP.196811251999032001

Lampiran 3.5 Surat Keterangan Selesai Penelitian



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jalan Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegalboto Kotak Pos 159 Jember 68121
Telp. (0331) 333356 Fax. (0331) 331991

SURAT KETERANGAN BEBAS TANGGUNGAN DAN SELESAI PENELITIAN
No: 035/ Biomedik / IV /2022

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dr.drg.Tecky Indriana, M. Kes
NIP : 196811261997022000
Jabatan : Kepala Laboratorium Biomedik
Institusi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dengan ini menerangkan bahwa :

Nama : KINTAN JETTANURUL MAHARANI
NIM : 181610101099
Fakultas/Prodi : Kedokteran Gigi / Pendidikan Dokter Gigi
Universitas : Universitas Jember

Yang bersangkutan Tidak Memiliki Tanggungan (Bebas Tanggungan) Laboratorium dan telah melaksanakan penelitian di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember , terhitung 14 Maret 2022 – 14 April 2022 guna penulisan tugas akhir dengan judul: “ Uji Antibakteri Ekstrak Daun Pegagan (*Cantella asiatica*) terhadap *Laktobacillus acidophilus* secara *inVitro*”.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 21 April 2022
Kepala Laboratorium Biomedik FKG

Dr.drg.Tecky Indriana, M. Kes
NIP. 196811261997022000



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
RUMAH SAKIT GIGI DAN MULUT
Jl. Kalimantan 37 Jember, Telp. 0331-325041

SURAT KETERANGAN

Nomor. 202204070001

Yang bertanda tangan dibawah ini :

N a m a : Nur Aziza, A.Md.Ak.
N I P : 198603052010122003
Pangkat/Gol. : Penata Muda / III-a

Menerangkan dengan sesungguhnya bahwa :

N a m a : Kintan Jettanurul Maharani
NIM. : 181610101099
Asal Instansi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Telah melaksanakan penelitian di Laboratorium Bioscience Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember dengan judul "Uji anti bakteri ekstrak daun peganggang (Centalla asiatica) terhadap Lactobacullus secara in Vitro"

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 07 April 2022

Analisis Medis,

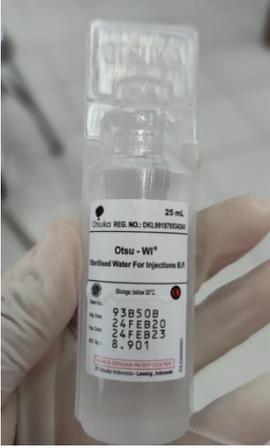

Nur Aziza, A.Md.Ak.
NIP. 198603052010122003

Lampiran 3.6 Alat Penelitian

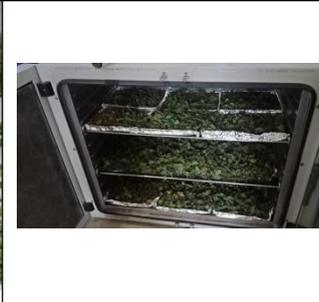
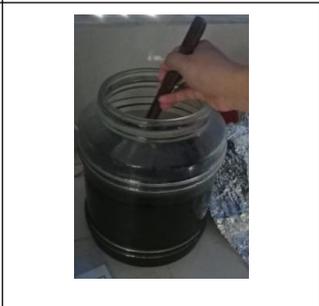
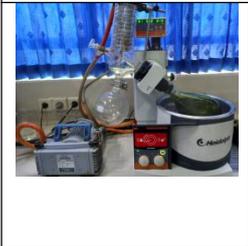
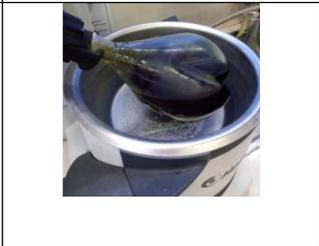
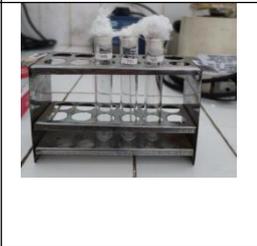
			
a. Oven	b. Blender	c. Toples	d. Pengaduk kaca
			
e. Mikroskop	f. <i>Rotary evaporator</i>	g. Erlenmeyer	h. Timbangan digital
			
i. Gelas ukur	j. Labu	k. Ose	l. Tabung reaksi

			
m. <i>Petridish</i>	n. Mikropipet	o. Inkubator	p. <i>Vortex</i>
			
q. Kertas Saring	r. Pinset	s. <i>Swab steril</i>	t. <i>Handsoen dan Masker</i>
			
u. Autoklaf	v. Bunsen	w. Jangka sorong	x. Alat McFarland
			
y. Neraca	z. Rak Tabung Reaksi	aa. LAF	ab. <i>Mikropipet tip</i>

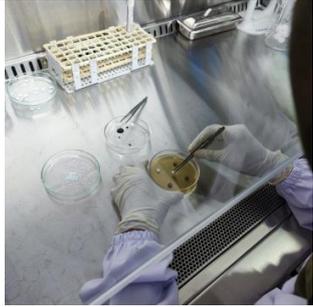
Lampiran 3.7 Bahan Penelitian

		
a. Daun Pegagan	b. Etanol 96%	c. Alkohol 70%
		
d. <i>Aquadest Sterile</i>	e. <i>Chlorhexidine gluconate 0,2%</i>	f. Paper disk (<i>Blank disk</i>)
		
g. MRSA	h. MRSB	i. Suspensi <i>Lactobacillus acidophilus</i>

Lampiran 3.8 Pembuatan Ekstrak Daun Pegagan

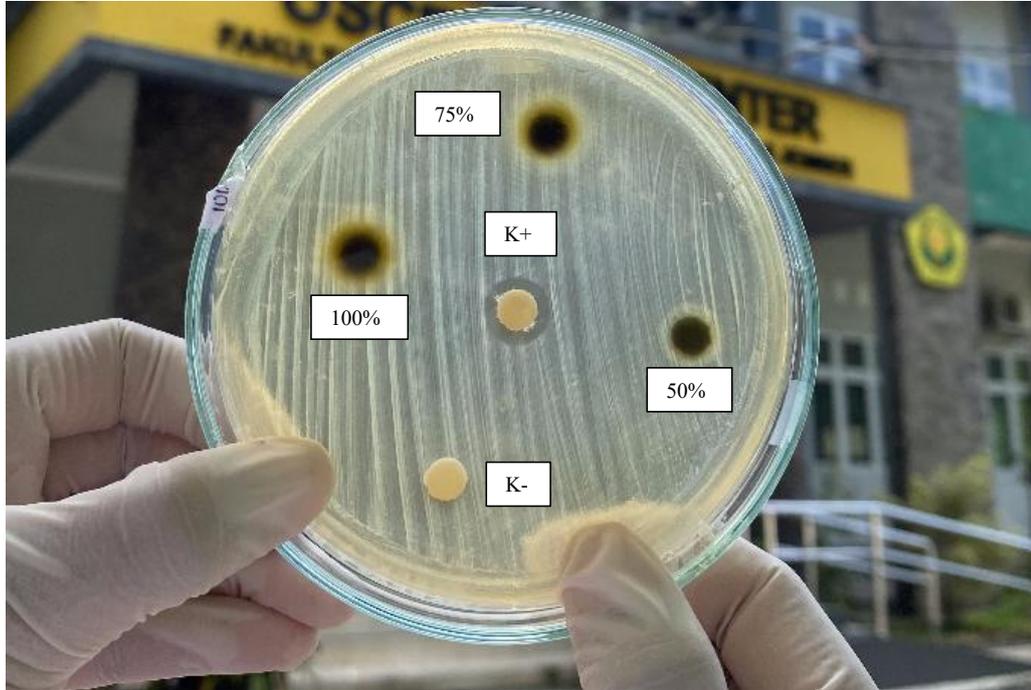
			
<p>1. Daun pegagan dicuci bersih kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung</p>	<p>2. Daun pegagan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 40-50°C untuk memastikan bahwa daun sudah kering.</p>	<p>3. Daun kering diblender hingga halus dan diayak hingga didapatkan serbuk halus</p>	<p>4. Sebanyak 541 gram serbuk halus daun pegagan dimasukkan ke dalam bejana maserasi</p>
			
<p>5. Simplisia ditambahkan 4,328 ml pelarut etanol 96% dan ditutup rapat selama 3 hari.</p>	<p>6. Setiap dua kali sehari dilakukan pengadukan</p>	<p>7. Penyaringan hasil maserasi dengan menggunakan kertas saring</p>	<p>8. Hasil saringan ekstrak daun pegagan dengan etanol 96%</p>
			
<p>9. Hasil saringan diuapkan dengan menggunakan <i>rotary evaporator</i> pada suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental 100%</p>	<p>10. Ekstrak kental daun pegagan setelah penguapan</p>	<p>11. Hasil akhir ekstrak kental disimpan dalam wadah</p>	<p>12. Persiapan konsentrasi ekstrak dengan perbandingan 1:1 menjadi konsentrasi 50%, 75%, dan 100%</p>

Lampiran 3.9 Prosedur Uji Antibakteri dengan metode *Disk Diffusion*

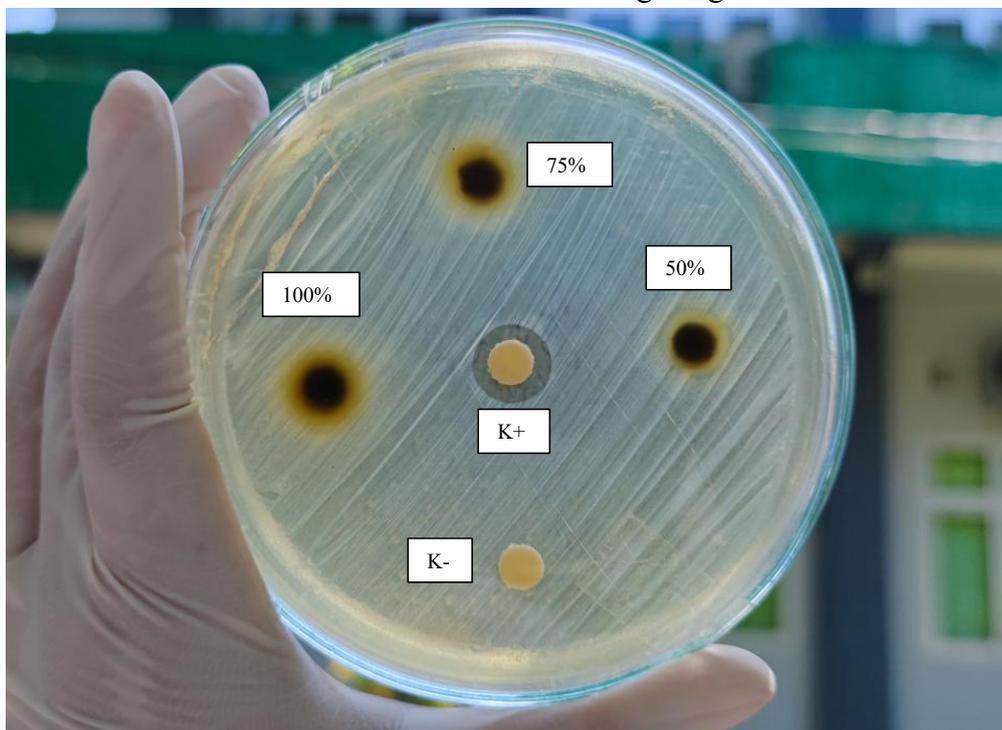
		
<p>1. Satu ose bakteri dilarutkan pada media cair MRS-B sebanyak 2 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam</p>	<p>2. Bakteri diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan NaCl 0,9% hingga sesuai dengan standard McFarland 0,5</p>	<p>3. Pengambilan suspensi bakteri dengan <i>swab</i> steril, kemudian diinokulasikan pada media MRS-A yang dilakukan dengan gerakan <i>streaking</i> dengan <i>swab</i></p>
		
<p>4. Pembuatan ekstrak daun pegagan dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100%</p>	<p>5. Mengambil kelompok perlakuan dan kelompok kontrol sebanyak 50 µl menggunakan mikropipet</p>	<p>6. Larutan kelompok perlakuan dan kontrol ditetaskan pada <i>paper disk</i> diluar <i>petridish</i> penelitian</p>
		
<p>7. <i>Paper disk</i> kemudian diletakkan di dalam <i>petridish</i> sesuai label</p>	<p>8. <i>Petridish</i> penelitian 5 kali pengulangan diletakkan dalam inkubator 37°C selama 24 jam</p>	<p>9. Setelah 24 jam, petridish dilakukan pengukuran diameter zona hambat sesuai dengan CLSI (2012)</p>

Lampiran 4.1 Foto Hasil Penelitian

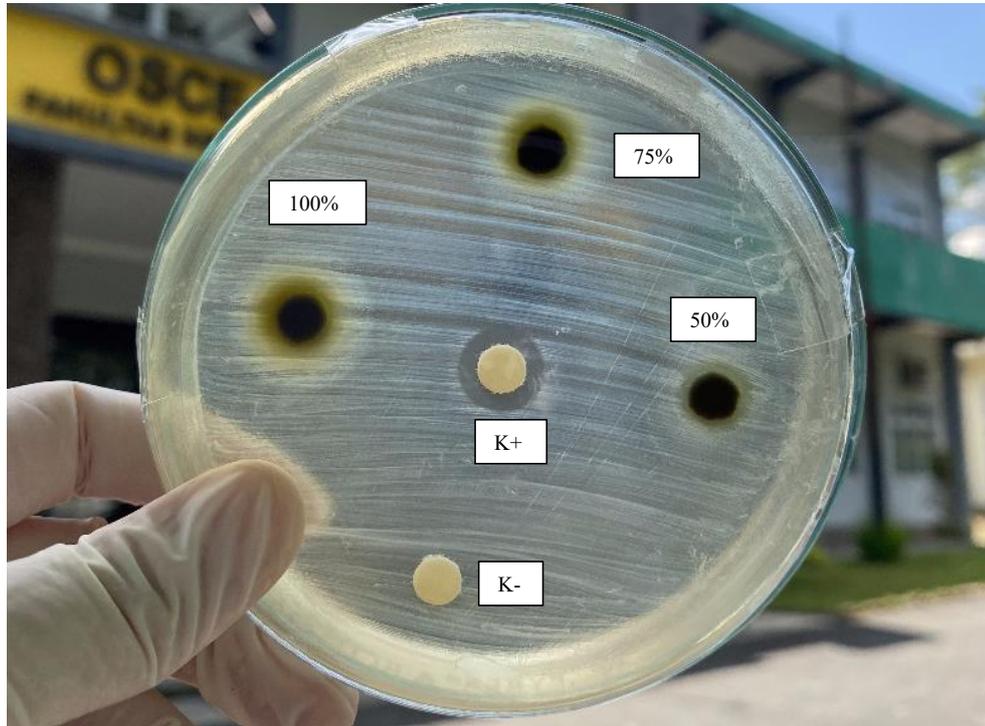
1. Hasil Dokumentasi *Petridish* Penelitian Pengulangan Ke-1



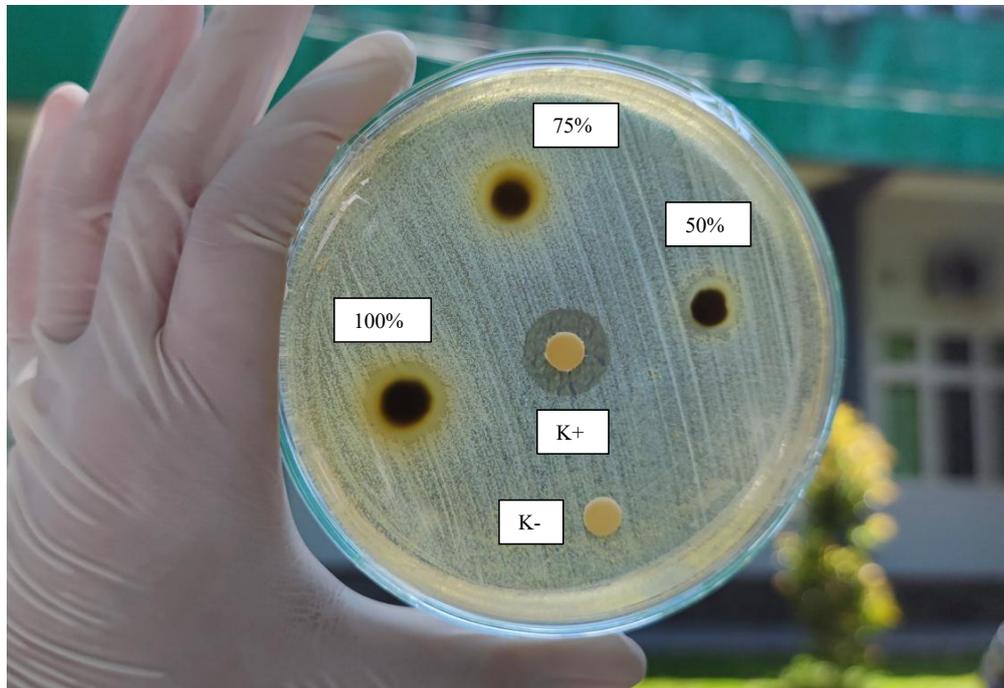
2. Hasil Dokumentasi *Petridish* Penelitian Pengulangan Ke-2

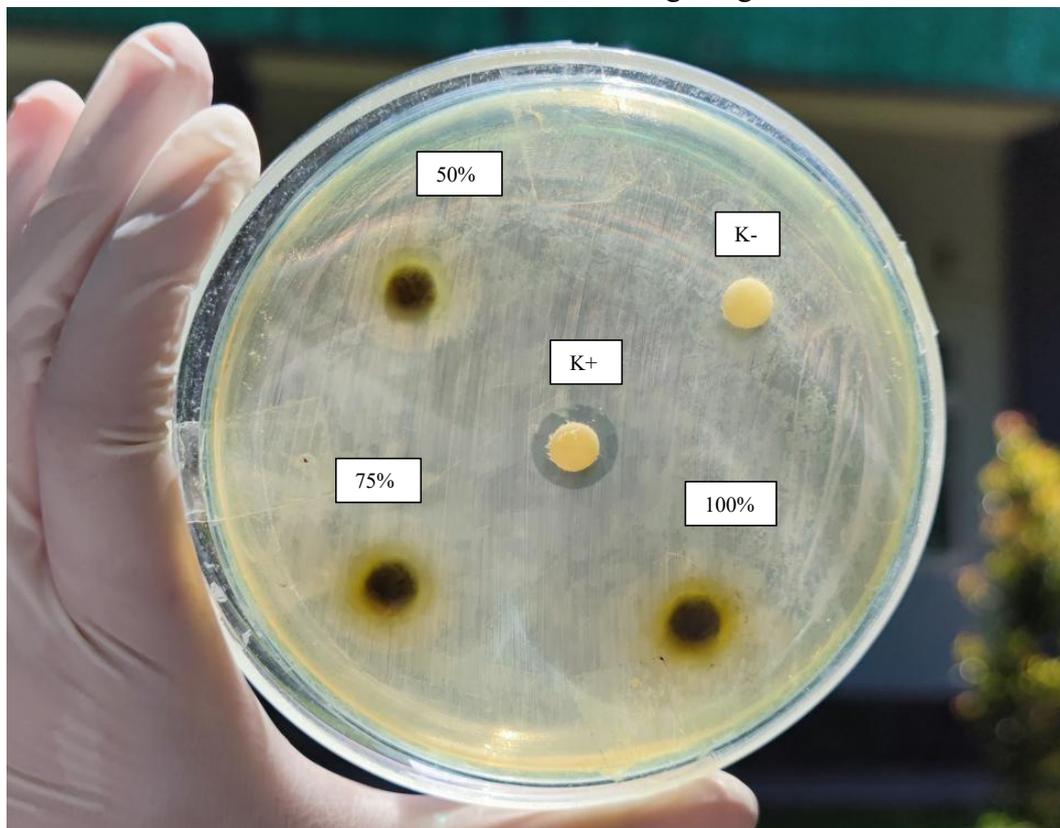


3. Hasil Dokumentasi *Petridish* Penelitian Pengulangan Ke-3



4. Hasil Dokumentasi *Petridish* Penelitian Pengulangan Ke-4



5. Hasil Dokumentasi *Petridish* Penelitian Pengulangan Ke-5

Lampiran 4. 2 Tabel Hasil Penelitian

No.	100%	75%	50%	Kontrol (+)	Kontrol (-)
1	10,37	9,97	729	9.64	0.00
2	10,89	9,88	8.97	10.37	0.00
3	10,78	9,97	8.92	10.88	0.00
4	11,95	11,21	9.73	13.46	0.00
5	11,62	10,71	9.11	10.57	0.00
Rata-rata (\bar{x})	11,12	10,35	8,80	10,98	0
Simpangan Baku (SB)	0,646	0,590	0,906	1,455	0

Lampiran 4.3 Uji Statistik Menggunakan SPSS Versi 25

1. Uji Normalitas dengan Menggunakan Uji *Shapiro Wilk*

	<i>Tests of Normality</i>					
	<i>Kolmogorov-Smirnov^a</i>			<i>Shapiro-Wilk</i>		
	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>	<i>Statistic</i>	<i>df</i>	<i>Sig.</i>
100%	.240	5	.200*	.940	5	.666
75%	.340	5	.060	.819	5	.114
50%	.351	5	.043	.847	5	.184
K+	.328	5	.083	.834	5	.149
K-	.	5	.	.	5	.

*. *This is a lower bound of the true significance.*

a. *Lilliefors Significance Correction*

2. Uji Homogenitas dengan Menggunakan *Levene Statistic*

		<i>Test of Homogeneity of Variances</i>			
		<i>Levene Statistic</i>	<i>df</i>	<i>df2</i>	<i>Sig.</i>
Hasil	<i>Based on Mean</i>	2.279	4	20	.097
Pengukuran	<i>Based on Median</i>	.994	4	20	.434
	<i>Based on Median and with adjusted df</i>	.994	4	9.880	.455
	<i>Based on trimmed mean</i>	1.921	4	20	.146

3. Uji One Way ANOVA

<i>ANOVA</i>					
<i>Hasil Pengukuran</i>					
	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	442.471	4	110.618	149.189	.000
<i>Within Groups</i>	14.829	20	.741		
<i>Total</i>	457.300	24			

4. Uji Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil Pengukuran LSD

(I) Kelompok Sampel	(J) Kelompok Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
100%	75%	.77400	.54460	.171	-.3620	1.9100
	50%	2.31800*	.54460	.000	1.1820	3.4540
	K+	.13800	.54460	.803	-.9980	1.2740
	K-	11.12200*	.54460	.000	9.9860	12.2580
75%	100%	-.77400	.54460	.171	-1.9100	.3620
	50%	1.54400*	.54460	.010	.4080	2.6800
	K+	-.63600	.54460	.257	-1.7720	.5000
	K-	10.34800*	.54460	.000	9.2120	11.4840
50%	100%	-2.31800*	.54460	.000	-3.4540	-1.1820
	75%	-1.54400*	.54460	.010	-2.6800	-.4080
	K+	-2.18000*	.54460	.001	-3.3160	-1.0440
	K-	8.80400*	.54460	.000	7.6680	9.9400
K+	100%	-.13800	.54460	.803	-1.2740	.9980
	75%	.63600	.54460	.257	-.5000	1.7720
	50%	2.18000*	.54460	.001	1.0440	3.3160
	K-	10.98400*	.54460	.000	9.8480	12.1200
K-	100%	-11.12200*	.54460	.000	-12.2580	-9.9860
	75%	-10.34800*	.54460	.000	-11.4840	-9.2120
	50%	-8.80400*	.54460	.000	-9.9400	-7.6680
	K+	-10.98400*	.54460	.000	-12.1200	-9.8480

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.