



**DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KATUK (*Sauropus androgynous* (L.
Merr.) TERHADAP *Streptococcus mutans***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
Untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter Gigi (S1)
Dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Ariska Cyntia Habsari
NIM 111610101098

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Purwanto, M.Kes
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2015



**DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KATUK (*Sauropus androgynus*
(L.) (Merr.) TERHADAP *Streptococcus mutans***

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

Ariska Cyntia Habsari

NIM 111610101098

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, atas segala limpahan karunia dan rahmatNya yang teramat besar. Segala puji hanya kepadaMu.
2. Nabi Muhammad SAW, atas segala tuntuna dan kasihnya kepada semua umatnya. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada beliau.
3. Ayahanda Drs, Arfa'i, M.Pd dan Ibu Endang Yuliati, Amd.Keb., atas perjuangan, kasih sayang, motivasi, serta doa yang tiada batas.
4. Kakakku Ayu Destalina Anggraeni S.Gz dan Adikku Andhika Firnanda Ramadhan, yang selalu menjadi penyemangat.
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi. Terima kasih telah memberikan ilmu dan bimbingan.
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang selalu aku banggakan. Semoga skripsi ini bermanfaat serta menambah referensi bagi ilmu pengetahuan khususnya di bidang Mikrobiologi.

MOTO

...Dan Allah mencintai orang-orang yang sabar

(Q.S. Ali 'Imran : 146) *)

Allah memperingatkan hanya orang-orang beriman dan berilmu
yang diangkat derajatnya

(terjemahan Surat *Al-Mujadalah* ayat 11)*)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2004. Syaamil Al-Qur'an dan Terjemahannya. Bandung : PT Syaamil Cipta Media.

*) Departemen Agama Republik. 1998. *Al- Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: PT. Kumudasmoro Grafindo.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Ariska Cyntia Habsari

NIM : 111610101098

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis yang berjudul “Daya Antibakteri Ekstrak Daun Katuk (*Sauropus androgynus (L). Merr.*) terhadap *Streptococcus mutans*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan hasil karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 03 November 2015

Yang menyatakan,

Ariska Cyntia H

NIM 111610101098

SKRIPSI

**DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KATUK (*Sauropus androgynus*
(*L. Merr.*) TERHADAP *Streptococcus mutans***

Oleh

Ariska Cyntia Habsari

NIM 111610101098

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Purwanto, M. Kes

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M. Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Daya Antibakteri Ekstrak Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L).
Merr.) terhadap *Streptococcus mutans*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 03 November 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, M.Si

NIP196705021997022001

Pembimbing Utama,

Dr. drg. Atik Kurniawati, M. Kes

NIP 197102041998022002

Pembimbing Pendamping,

Dr. drg. Purwanto, M. Kes

NIP 195710241986031002

drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes

NIP197012191999032001

Mengesahkan

Dekan,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M. Kes

NIP 19690112199611001

RINGKASAN

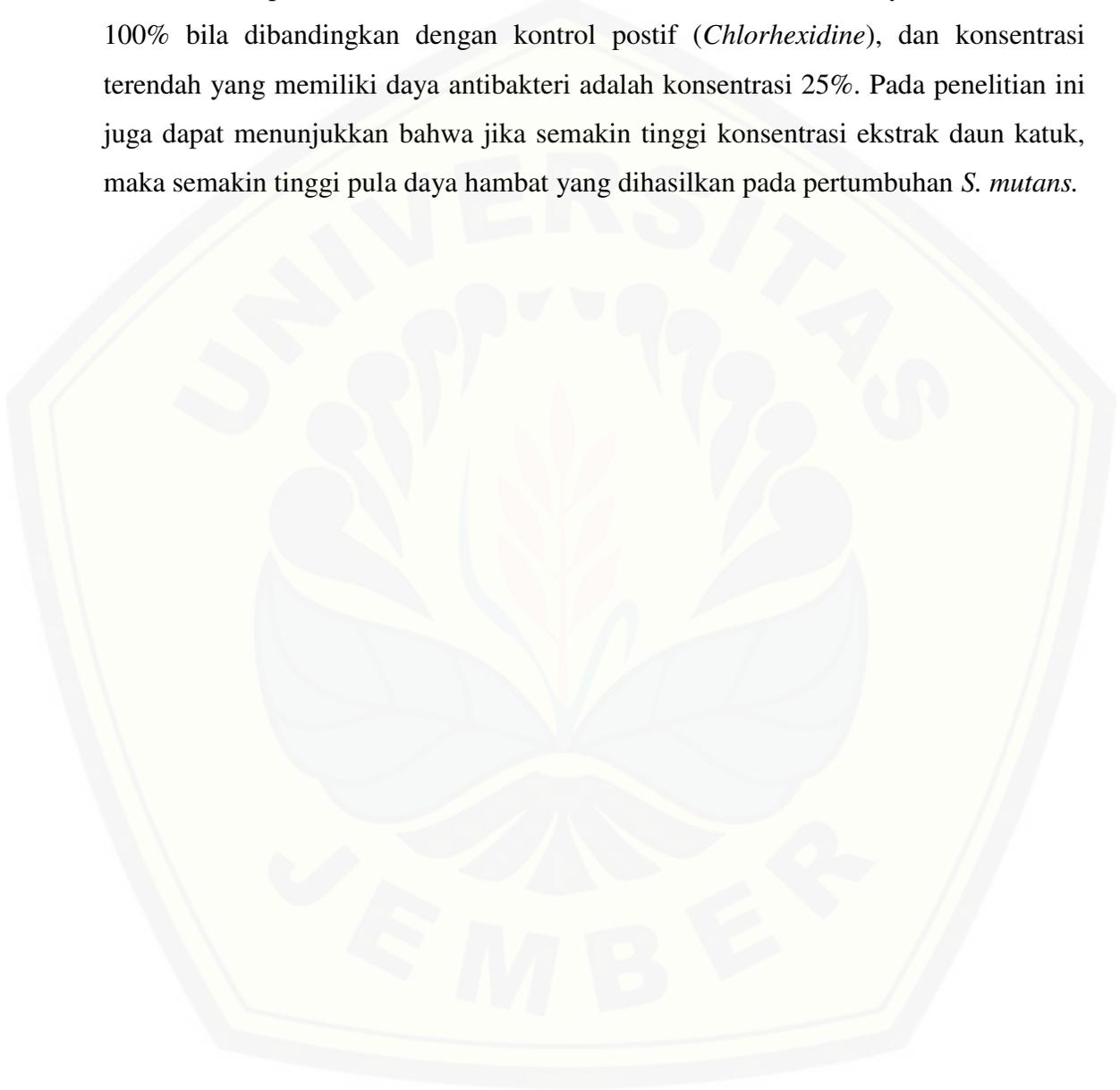
Daya Antibakteri Ekstrak Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L). Merr.) terhadap *Streptococcus mutans*: Ariska Cyntia Habsari; 111610101098;2015;53 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Katuk merupakan salah satu tanaman yang sering dijumpai di Indonesia. Salah satu bahan alam yang telah diketahui manfaat serta kandungannya oleh masyarakat yang dipercaya mampu mengobati penyakit. Daun katuk memiliki kandungan yang berfungsi sebagai daya antibakteri, di antaranya yaitu flavonoid, saponin, dan tanin. Sehingga, diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatan bahan herbal sebagai obat alternatif.

Jenis penelitian ini yaitu eksperimental laboratoris, dengan rancangan penelitian *post only control group design*. Sampel yang digunakan terbagi menjadi 5 kelompok perlakuan yaitu E100, E50, E25, K+, dan K-. *Petridish* yang berisi media BHI-A yang telah diinokulasi *S. mutans* diisi dengan bahan perlakuan kelima kelompok sesuai dengan kode kelompok. Kemudian 8 *petridish* dimasukkan ke dalam desikator dan diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah 24 jam dilakukan pengukuran zona hambat dengan jangka sorong.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok K+ memiliki diameter terbesar yaitu 10,14 mm dan diameter terkecil pada kelompok E25 yaitu sebesar 7,26 mm. Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis data dengan *Kolmogrov Smirnov* uji normalitas dan hasilnya berdistribusi normal. Dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* dan hasilnya homogen. Data yang didapat berdistribusi normal dan homogen selanjutnya dilakukan uji *Oneway anova* guna mengetahui adanya perbedaan bermakna. Kemudian dilanjut dengan uji *LSD* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan antar kelompok perlakuan. Hasilnya data memiliki perbedaan yang bermakna.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun katuk memiliki potensi daya antibakteri dengan menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Pada penelitian ini konsentrasi efektif ekstrak daun katuk yaitu konsentrasi 100% bila dibandingkan dengan kontrol positif (*Chlorhexidine*), dan konsentrasi terendah yang memiliki daya antibakteri adalah konsentrasi 25%. Pada penelitian ini juga dapat menunjukkan bahwa jika semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun katuk, maka semakin tinggi pula daya hambat yang dihasilkan pada pertumbuhan *S. mutans*.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT. Atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Daya Anti bakteri Ekstrak Daun Katuk (*Sauropus androgynous* (L). Merr.) terhadap *Streptococcus mutans*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. Dr. drg. Purwanto, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
3. drg. Dwi Warna Aju Fatmawati, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, M.Si., selaku Dosen Penguji Ketua dan Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes., yang telah memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. drg. Agustin Wulan Suci D, MDSc., selaku Dosen Pembimbing Akademik, yang selalu memberikan bimbingan dan motivasi dalam perjalanan studi selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Ayah dan Drs. Arfa'i, M.Pd., dan ibu Endang Yuliati Amd. Keb., terimakasih atas doa yang terus engkau panjatkan, motivasi, kasih sayang dan kesabaran yang amat besar untukku;
7. Kakakku Ayu Destalina Anggraeni, S.Gz., adikku Andhika Firnanda Ramadhan dan Muammar Fahriza Elmeiri, S.T., yang telah menjadi penyemangatu.

8. sahabat-sahabatku baik dari SMA maupun dari Kuliah. Terimakasih atas dukungan, motivasi, dan doanya.
9. teman-teman satu bimbingan skripsi
10. teman-teman FKG 2011. Terimakasih atas motivasi, dan kerjasamanya selama ini.
11. Seluruh staf dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 03 November 2015

Penulis

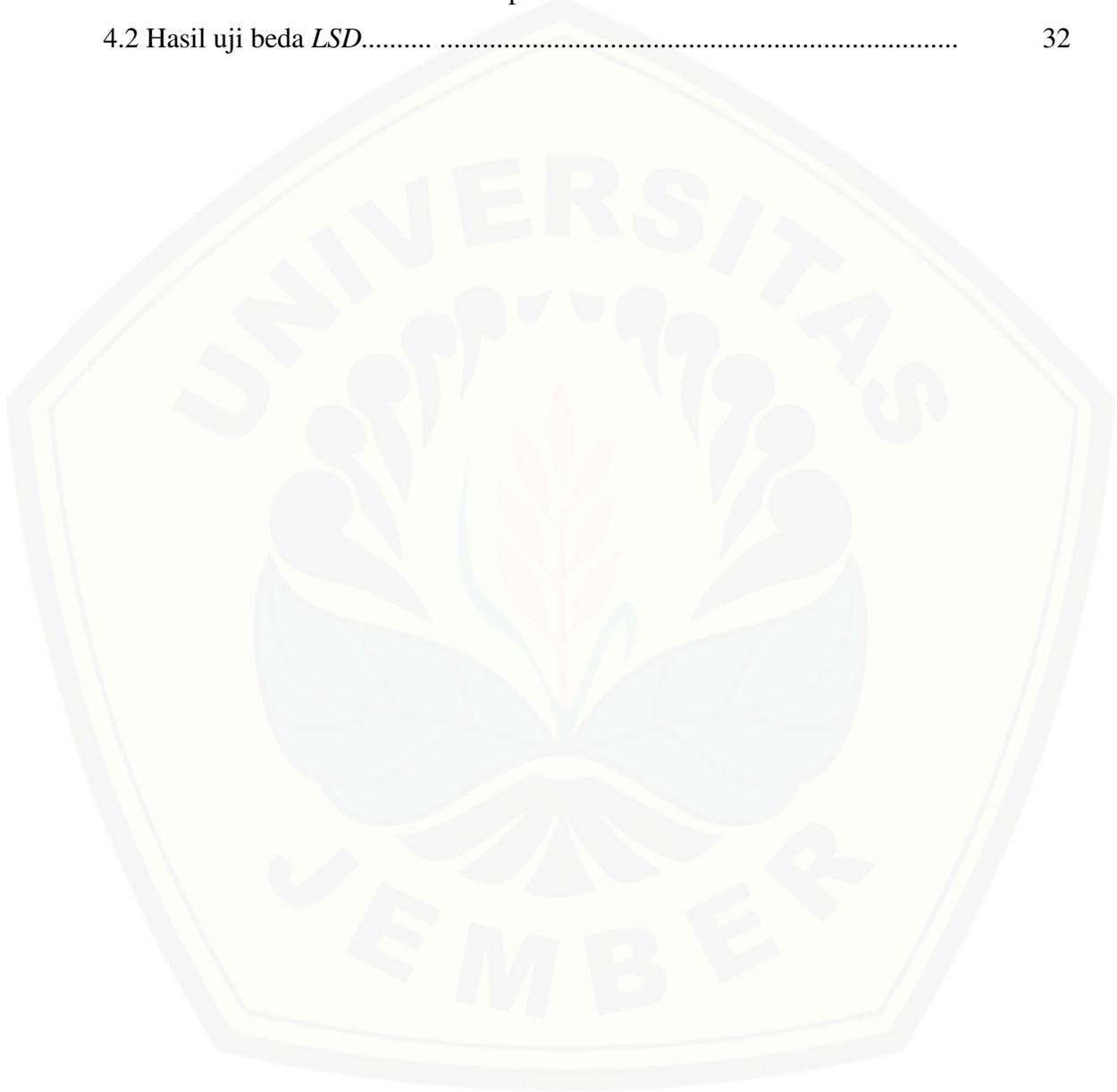
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	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.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Plak Gigi	4
2.2 <i>Streptococcus mutans</i>	5
2.3 Daun Katuk (<i>Sauropus androgynus (L.) Merr.</i>).....	7
2.4 Obat Kumur	9
2.5 Ekstrak.....	10
2.6 Daya Antibakteri.....	11
2.7 Kerangka Konsep.....	13
2.8 Hipotesis.....	13

BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Jenis Penelitian.....	14
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
3.3 Variabel Penelitian.....	14
3.4 Definisi Operasional.....	14
3.5 Sampel Penelitian.....	16
3.6 Alat dan Bahan.....	16
3.7 Prosedur Penelitian.....	17
3.8 Analisis Data.....	28
3.9 Alur Penelitian.....	29
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1 Hasil Penelitian.....	30
4.2 Pembahasan.....	32
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
5.1 Kesimpulan.....	35
5.2 Saran.....	35
DAFTAR BACAAN.....	36
LAMPIRAN.....	41

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan <i>S. mutans</i>	31
4.2 Hasil uji beda <i>LSD</i>	32



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Bakteri <i>S. mutans</i>	6
2.2 Struktur dinding sel <i>S. mutans</i>	7
2.3 Tanaman katuk.....	8
3.1 Daun katuk segar, dan daun katuk kering	18
3.2 Penghalusan daun katuk, simplisia halus daun katuk, dan penimbangan.....	19
3.3 Rendaman simplisia dengan etanol 96%	19
3.4 Penyaringan rendaman, evaporator, dan hasil ekstrak daun katuk.....	20
3.5 Hasil pewarnaan Gram pada <i>S. mutans</i>	21
3.6 Pemberian label pada 8 <i>petridish</i>	22
3.7 Media BHI-A yang diinokulasi <i>S. mutans</i>	23
3.8 Pembuatan sumuran pada media BHI-A.....	24
3.9 Pengenceran ekstrak daun katuk.....	25
3.10 Pemberian ekstrak daun katuk, kontrol positif , dan kontrol negatif.....	26
3.11 Pengukuran zona hambat dengan jangka sorong	27
3.12 Diagram alur penelitian.....	29
4.1 Histogram rata-rata zona hambat pertumbuhan <i>S.mutans</i>	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan jumlah sampel penelitian	41
B. Hasil pengukuran diameter zona hambat	41
C. Analisis data	42
D. Foto hasil penelitian	45
E. Foto alat dan bahan penelitian	47
F. Surat keterangan	50
G.1 Surat Hasil Identifikasi Daun Katuk	50
G.2 Surat Hasil Pewarnaan Gram <i>S. mutans</i>	51
G.3 Hasil Identifikasi Bakteri <i>S. mutans</i>	52
G.4 Surat Pembuatan Ekstrak	53



BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Plak gigi memegang peranan penting dalam menyebabkan terjadinya masalah kesehatan gigi dan mulut pada manusia. Plak adalah masa lunak yang berupa gel, menempel pada permukaan gigi terdiri atas bakteri dan produk-produknya, bahan organik dan anorganik (Manson dan Eley, 2004:45). Pada plak terdapat berbagai macam bakteri dan hasil metabolismenya, sebagai contoh hasil dari metabolisme karbohidrat oleh bakteri asidogenik dapat menghasilkan penimbunan asam yang mengakibatkan terjadinya dekalsifikasi dan destruksi permukaan gigi sehingga terjadi karies (Putri *et al.*, 2010:71). Menurut Fitzgerald dan Keyes (1960) dalam Pratiwi (2005:64), menyatakan bahwa plak yang didominasi oleh bakteri *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) dapat menyebabkan terbentuknya karies.

S. mutans merupakan mikroorganisme paling kariogenik dalam rongga mulut karena kemampuan asidurik dan asidogeniknya yang tinggi (Korithoski *et al.*, 2005:4451). *S. mutans* sebagai bakteri Gram Positif dapat tumbuh dalam suasana fakultatif anaerob dan menjadi bakteri plak utama untuk karies gigi (Khairan, 2007:5). Mekanisme terjadinya plak gigi diawali dengan deposisi pelikel pada permukaan gigi sehingga terjadi kolonisasi bakteri. Kemudian Bakteri yang melekat dipermukaan gigi diperantarai oleh lapisan tipis protein saliva dan glikoprotein yang akan menutupi permukaan gigi. Akibat adanya karbohidrat, kolonisasi bakteri akan membentuk polisakarida intraseluler dan ekstraseluler yang berperan dalam perlekatan, pembentukan, dan resistensi plak gigi (Venkataramaiah dan Biradar, 2011:24).

Pencegahan plak pada permukaan gigi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu cara mekanis dan kimiawi. Cara mekanis dengan menggunakan sikat gigi atau menggunakan *dental floss*. Cara kimiawi dengan menggunakan pasta gigi dan obat

kumur (Pratiwi, 2007:43). Salah satu bahan obat kumur yang banyak digunakan dipasaran yaitu *chlorhexidine*, dan menurut Balakrishnan *et al.*, (2000:240), obat kumur yang paling sering digunakan adalah *chlorhexidine*. *Chlorhexidine* ini efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif (Balakrishnan *et al.*, 2000:240; Gupta *et al.*, 2012:43). Tetapi, penggunaan *Chlorhexidine* dalam jangka panjang tidak dianjurkan karena dapat terjadi efek samping yang tidak diharapkan. Beberapa efek samping yang dapat terjadi yaitu gangguan pengecap, perubahan warna pada gigi, dan membran mukosa, serta peningkatan pembentukan kalkulus (Farah, *et al.*, 2009:162).

Dewasa ini pemanfaatan sumber daya alam sebagai obat alternatif sudah semakin berkembang karena memiliki banyak manfaat, relatif lebih murah, mudah didapat, dan mampu meminimalisir adanya efek samping. Indonesia kaya akan tanaman obat, dan masyarakat sudah sejak dahulu menggunakan obat herbal untuk mengatasi kesehatannya. Salah satu tanaman yang lama dikenal sebagai obat tradisional adalah daun katuk. Daun katuk (*Sauropus androgynus (L). Merr.*) memiliki banyak manfaat seperti mengatasi sembelit, pelancar ASI (Air Susu Ibu), pewarna alami dan dikonsumsi sebagai sayuran (Santoso, 2008:54).

Hasil penelitian Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia menyatakan bahwa daun katuk (*Sauropus androgynus (L). Merr.*) mempunyai kandungan senyawa kimia, antara lain mineral, protein, flavonoid, tanin, dan saponin. Beberapa senyawa kimia pada daun katuk diketahui sebagai obat (Rukmana dan Harahap, 2003:19-20). Kandungan flavonoid pada daun katuk mempunyai aktifitas antibakteri karena memiliki kemampuan berinteraksi dengan DNA bakteri, interaksi tersebut mengakibatkan kerusakan permeabilitas pada dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom (Sabir, 2003:85). Selain itu, pada hasil penelitian Khalasha(2013:45) menunjukkan bahwa ekstrak daun katuk efektif sebagai antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Berdasarkan uraian tersebut, maka penulis ingin melakukan penelitian lebih lanjut tentang daya antibakteri ekstrak

daun katuk terhadap pertumbuhan *S. mutans* dengan konsentrasi 100%, 50% dan 25%.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah konsentrasi 100%, 50%, dan 25% memiliki daya antibakteri terhadap *S. mutans*?
2. Berapa konsentrasi minimum yang masih menunjukkan adanya daya antibakteri terhadap *S. mutans*?
3. Konsentrasi berapakah yang setara dengan *chlorhexidine*?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah, maka didapat tujuan sebagai berikut :

1. Mengetahui adanya daya antibakteri terhadap *S. mutans* pada konsentrasi 100%, 50%, dan 25%.
2. Mengetahui konsentrasi minimum ekstrak daun katuk sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *S. mutans*.
3. Mengetahui konsentrasi ekstrak daun katuk yang setara dengan *chlorhexidine*.

1.3 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Salah satu bahan alternatif yang dapat digunakan untuk mencegah terjadinya karies gigi.
2. Sebagai salah satu alternatif tanaman yang dapat digunakan sebagai obat kumur untuk mencegah terjadinya karies.
4. Dapat menjadi dasar penelitian lebih lanjut di bidang kesehatan.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Plak Gigi

Plak gigi merupakan suatu lapisan lunak yang melekat di permukaan gigi, dan terdiri dari mikroorganisme yang berkembang biak dalam matrik intraseluler. Plak yang jumlahnya sedikit tidak akan tampak dengan mata kecuali jika diwarnai menggunakan larutan *disclosing*. Pembersihan plak yang kurang baik dapat menyebabkan plak semakin melekat dan akan menjadi karang gigi setelah mengalami kalsifikasi. Plak yang menumpuk akan terlihat abu-abu, kuning, dan abu-abu kekuningan (Putri *et al.*, 2010:56).

Mekanisme dari pembentukan plak diawali dengan deposisi pelikel pada permukaan gigi. Kemudian pelikel terjadi kolonisasi bakteri, kemudian bakteri kokus gram positif yang terlibat dalam lapisan awal pada pelikel yaitu *S. mutans*, *S. oralis*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *S. sanguis* dalam kurun waktu 24 jam (Venkataramaiah dan Biradar, 2011:24). Menurut Sbordone dan Bortolaia (dalam Venkataramaiah dan Biradar, 2011:24) juga terlibat bakteri gram negatif antara lain *Veillonella parvula* dan *Neisseria sp.* Bakteri melekat di permukaan gigi diperantarai oleh lapisan tipis protein saliva dan glikoprotein yang akan menutupi permukaan gigi. Kemudian akibat dari adanya karbohidrat, kolonisasi bakteri ini akan membentuk polisakarida intraseluler dan ekstraseluler dan keduanya berperan dalam perlekatan, pembentukan dan resistensi plak gigi. Aktivitas dari plak inilah yang berperan penting dalam proses awal terjadinya karies gigi.

Komposisi yang terdapat pada plak gigi sebagian besar terdiri atas air dan berbagai macam mikroorganisme. Pada awal pembentukan plak, kokus gram positif merupakan jenis yang paling banyak dijumpai seperti *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis* dan *S. salivarius* serta beberapa *strain* lainnya. *S. mutans* diakui sebagai penyebab

utama karies oleh karena *S. mutans* mempunyai sifat asidogenik dan asidurik (reisten terhadap asam) (Pintauli dan Hamada, 2008:6).

2.2 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans adalah bakteri gram positif. *S. mutans* dikenalkan pertama kali oleh J. K. Clarke pada tahun 1924 setelah mengisolasi dari suatu lesi karies. Bakteri ini fakultatif anaerob paling sering ditemukan dalam rongga mulut manusia (Clarke dalam Banu, 2010:11). Menurut Boel (2008:8-9), *S. mutans* dapat dibedakan dari *Streptococcus* lainnya melalui kemampuan fermentasi sorbitol, koloni dan kemampuan sintesis dextran dan levan. *S. mutans* hingga saat ini dikenal tujuh spesies, yaitu : *S. mutans* (serotip *c*, *e*, dan *f*), *S. ratus* (serotip *b*), *S. macacae* (serotip *c*), dan *S. downei* (serotip *h*), *S. aricetus* (serotip *a*), *S. sobrinus* (serotip *d*, dan *g*), dan *S. ferus* (serotip *c*) (Balakrishnan *et al*, 2000:236).

Menurut Samaranayake (2012:265), klasifikasi dari *Streptococcus mutans* sebagai berikut :

<i>Kingdom</i>	: <i>Monera</i>
<i>Diviso</i>	: <i>Firmicutes</i>
<i>Class</i>	: <i>Lactobacilalles</i>
<i>Family</i>	: <i>Streptococcaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Streptococcus</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Streptococcus mutan</i>

S. mutans merupakan bakteri gram positif. *S. mutans* memproduksi bermacam enzim dan juga substansi ekstraseluler. Bentuk dari bakteri ini yaitu ovoid kokus (Lee, *et al.*, (2006:67). Dalam berkoloni *S. mutans* berpasangan, tidak bergerak maupun berspora dan juga dapat hidup dalam keadaan anaerob fakultatif. Biasanya koloni *S. mutans* dapat ditemukan dalam pit, dan fisur, permukaan oklusal, area proksimal permukaan gigi, dan gingiva. Bakteri ini tumbuh pada temperature optimum sekitar 37⁰ C (Octiara dan Sarworini, 2008:180).

Diketahui bahwa, *S. mutans* merupakan salah satu penyebab terjadinya karies pada gigi (Korithoski, *et al*, 2005:4451-4456). Bakteri ini merupakan bakteri yang

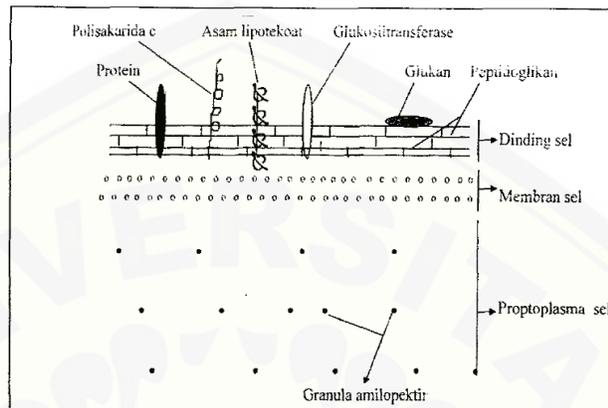
bersifat kariogenik karena memiliki kemampuan menghasilkan asam dari karbohidrat yang difermentasi. Dalam proses awal terjadinya plak yaitu melekatnya pelikel pada email gigi, dan terjadi interaksi antara bakteri dengan pelikel. Hal ini dapat meningkatkan produksi asam yang berlebihan daripada saliva yang sebagai penetralisir (Forssten *et al.* 2010:291). Asam yang diproduksi merupakan asam laktat. Asam laktat penyebab paling penting dalam etiologi karies gigi merupakan asam yang paling kuat dan diproduksi dalam jumlah besar oleh *S. mutans* (Balakrishnan *et al.* (2000:237). Asam akan terus diproduksi oleh bakteri kemudian secara perlahan-lahan akan merusak gigi (Pratiwi, 2007:25). Dalam perlekatannya pada plak gigi *S. mutans* juga memproduksi endodekstran (Balakrishnan, *et al.* 2000:238).



Gambar 2.1 Bakteri *Streptococcus mutans* (sumber : Kunkel, 2006).

Streptococcus mutans terdiri dari dinding sel dan membran protoplasma. Matriks dinding sel terdiri atas peptidoglikan rantai silang yang mempunyai gula amino N-asetil, asam N-asetilnuramik dan beberapa peptida. Sedangkan struktur antigenik dinding sel *Streptococcus mutans* terdiri dari antigen protein, polisakarida spesifik dan asam lipotekoat. Antigen-antigen tersebut menentukan imunogenitas *Streptococcus mutans* (Lenher T, 1995:26-41). Sejumlah antigen yang telah ditemukan yang terpenting adalah protein, terdiri dari enzim glukosiltransferase dan antigen protein. Enzim glukosiltransferase tersebut berfungsi sebagai enzim yang mengubah sukrosa menjadi glukosa. Sedangkan antigen protein yang bersifat

hidrofobik berfungsi pada proses interaksi *Streptococcus mutans* dan pelikel-pelikel di permukaan gigi (Guo JH, *et al.*, 2004:70-266).



Gambar 2.2. Struktur dinding sel *Streptococcus mutans* (Bachtiar, 1997:4:641-7)

2.3 Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L). Merr.)

Tanaman katuk merupakan tanaman yang lama dikenal sejak nenek moyang kita sejak abad ke-16 (Santoso, 2008:51). Tanaman katuk mempunyai beberapa nama daerah antara lain, katukan (Jawa), cekop manis atau memata (Melayu), katuk (Sunda), dan karekur (Madura). Tanaman katuk ini tumbuh di dataran rendah hingga 1.200 m dpl dan banyak ditanam di kebun ladang atau pekarangan (Muhlisah, 2002:29).

Penyebaran tanaman katuk di Indonesia banyak dijumpai di Jawa (Banyuwangi, Pekalongan, Rembang, Semarang, Jakarta, Purwokerto, Kediri, Pasuruan, Surakarta, Bogor, Subang, Situbondo, Malang, Jepara, Tulungagung, Madiun, dan Madura). Sedangkan penyebaran di luar Indonesia, antara lain dijumpai di Filipina, Malaysia (Setyowati, 1997:54-55). Untuk perbanyak tanaman katuk ini diperbanyak dengan setek batang yang belum terlalu tua. Penanamannya dapat diatur di pekarangan sebagai pagar hidup. Apabila produksidaun sudah sedikit, tanaman ini dapat dilakukan pemangkasan batang utama (Muhlisah, 2002:30)

Tanaman katuk berbentuk perdu berumpun, dengan ketinggian 3 – 5 m. Batangnya tumbuh tegak dan berkayu. Jika ujung batang dipangkas, akan tumbuh tunas – tunas baru yang membentuk percabangan. Sedangkan untuk daunnya kecil – kecil sekilas mirip dengan daun kelor berwarna hijau. Bunga dari tanaman katuk ini kecil – kecil, warna merah gelap sampai kekuningan, dengan bintik merah. Tanaman katuk ini juga mempunyai buah yang berwarna putih yang didalamnya terdapat biji berwarna hitam dan berukuran kecil – kecil (Santoso, 2008:52). Daun katuk berbeda dengan daun kelor, yang membedakan daun katuk dengan daun kelor yaitu buah dari daun kelor berbentuk segitiga memanjang yang disebut *klentang* dan daunnya berbentuk bulat telur kecil tingginya bisa mencapai 6 meter (A.N.S, 1992:67).

Menurut Becker dan Brink (1963), klasifikasi tanaman katuk sebagai berikut :

Divisi	: <i>Spertmathopyta</i>
Anak divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Monoclamydae (Apetalae)</i>
Bangsa	: <i>Euphorbiales</i>
Suku	: <i>Euphorbiaceae</i>
Marga	: <i>Sauropus</i>
Jenis	: <i>sauropus androgynus (L.) Merr.</i>



Gambar 2.3. (*Sauropus androgynus (L.) Merr.*) (sumber : <http://toptropicals.com>)

Sampai saat ini, tanaman katuk yang tumbuh di alam belum dikarakteriskan menurut jenis dan varietasnya. Tetapi, dilapangan dikenal dua jenis, yaitu katuk hijau

dan katuk merah. Katuk hijau disebut baster, jenis katuk ini lebih produktif menghasilkan daun berwarna hijau dan jenis katuk ini yang sering dibudidayakan oleh masyarakat. Sedangkan untuk katuk merah kurang produktif dalam menghasilkan daun dan memiliki daun-daun yang berwarna kemerahan, dan katuk ini tumbuh secara liar atau ditanam sebagai tanaman hias (Rukmana dan Harapap, 2003:19-21).

Tanaman daun katuk merupakan tanaman yang kaya akan zat gizi, dan biasanya dikonsumsi sebagai sayur ataupun lalapan dalam menu sehari-hari.. Kandungan kalori, protein, dan karbohidrat yang dimiliki daun katuk hampir sama dengan daun pepaya dan daun singkong. Daun katuk juga kaya vitamin (A, B1, dan C), protein, lemak, dan mineral. Selain itu, daun katuk juga mengandung tanin, saponin, flavonoid, dan alkaloid papaverin, sehingga sangat ampuh dijadikan obat tradisional (Santoso, 2008:53).

Manfaat dari daun katuk yang paling banyak dikenal dimasyarakat yaitu sebagai pelancar produksi ASI. Senyawa dalam daun katuk yang berperan untuk melancarkan ASI adalah asam seskuiterpena. Selain itu juga daun katuk mempunyai manfaat lain seperti mengatasi sembelit, pewarna alami dan sebagai masakan dan minuman (Santoso, 2008:54).

Jika daun katuk direbus, rebusan daun katuk memberikan rasa yang agak asam dan manis. Air dari perasan daun katuk juga digunakan untuk memberi warna pada makanan, selain itu juga air rebusan daun dan akar katuk dapat digunakan sebagai obat demam, dan diuretika (Nurendah *et. al.* 1997:45).

2.4 Obat Kumur

Obat kumur memiliki berbagai macam jenis dan fungsi masing-masing, diantaranya sebagai berikut: (a) Obat Kumur antiinflamasi ini mengandung *benzylamine hydrochloride* atau kombinasi *chlorhexidine* (Zyl dan Heerden, 2010:122); (b) Obat kumur analgesik ini salah satunya *benzylamine hydrochloride* yang mempunyai efek analgesik (Zyl dan Heerden, 2010:122); (c) Obat kumur

minyak atsiri mengandung mentol, timol dan metil salisilat. Obat kumur ini memiliki aktivitas antibakteri spektrum luas. Kemampuan obat kumur minyak atsiri dalam menurunkan plak ini mencapai 20%-35% (Newman, *et al.*, 2002:666). Karena kandungannya mengandung alkohol 26% jadi obat kumur ini enggan digunakan oleh masyarakat maupun klinisi; (d) *Chlorhexidine* ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif (Balakrishnan *et al.*, 2000:240; Gupta *et al.*, 2012:43). Menurut Newman *et al.*, (2002:666), pemakaian obat kumur ini selama 2 hari dengan 10ml dari 0,2% *chlorhexidine gluconate* dapat menghambat pembentukan plak gigi, kalkulus, dan gingivitis. Penggunaan dalam jangka panjang tidak dianjurkan untuk obat kumur jenis ini karena dapat menyebabkan efek samping diantaranya seperti perubahan warna pada gigi, dan restorasi silikat dan resin (Newman, *et al.*, 2002:666); (e) Obat kumur pengganti saliva. Obat kumur ini menurut Eveson (dalam Zyl dan Heerden, 2010:122) berfungsi untuk membantu makan dan menelan, dan berbicara. Obat kumur ini digunakan pada penderita *xerostomia*. Salah satu contoh yaitu obat kumur *betadine olive oil base non alkohol*; dan (f) Obat Kumur Fluoride. Obat kumur ini digunakan untuk mencegah terjadinya karies. Banyak obat kumur yang dikombinasikan dengan *fluoride* untuk mencapai kedua fungsi yang dimilikinya. Salah satu obat kumur ini adalah obat kumur yang mengandung 0,5% *sodium fluoride* (Zyl dan Heerden, 2010:122).

2.5 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kental atau cair diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi standar yang ditetapkan (Ditjen POM, 1979:639). Sedangkan ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair (Depkes RI, 2000:1). Ekstraksi dengan menggunakan pelarut dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu cara

panas dan cara dingin. Cara panas dibagi lagi menjadi beberapa macam, yaitu cara Soxhlet adalah ekstraksi dengan pelarut yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi *continue* dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik, cara refluks adalah cara ekstraksi menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik, cara infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit, dan cara dekok adalah infusa pada waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan suhu sampai titik didih air (Depkes RI, 2000:11). Sedangkan cara dingin dibagi dua macam, yaitu cara maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama. Pada penelitian ini menggunakan metode maserasi, dikarenakan mempunyai banyak keuntungan dibandingkan dengan metode lainnya. Keuntungan utama metode ekstraksi maserasi yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, dan cara perlokasi merupakan ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada suhu ruangan. Prosesnya terdiri dari tahap maserasi antara, tahap pengembangan bahan, dan tahap perlokasi sebenarnya (penampungan ekstrak).

2.6 Daya Antibakteri

Daya antibakteri merupakan suatu kemampuan suatu zat atau senyawa dalam membunuh produksi bakteri (Dorland, 2010:115). Antibakteri ini bekerja dengan melalui empat cara, yaitu yang pertama inhibisi fungsi membran sel. Membran sitoplasma yang bekerja sebagai barrier permeabilitas selektif, berfungsi sebagai transport aktif. Jika integritas fungsional membran sitoplasma terganggu, maka makromolekul dan ion dapat keluar dari sel dan menyebabkan kerusakan sel (Brooks, *et al.* 2005:353-362). Cara kedua yaitu inhibisi sintesis dinding sel, dinding sel

mengandung peptidoglikan yang berciri khas secara kimiawi terdiri dari polisakarida dan polipeptida. Peptidoglikan lapisannya lebih tebal pada dinding sel bakteri gram positif daripada gram negatif. Jika tekanan osmotik pada sel bakteri lebih tinggi karena inhibisi maka dapat menyebabkan lisis pada sel tersebut (Brooks, *et al.* 2005:353-362). Cara yang ketiga yaitu inhibisi sintesis asam nukleat, rifampin merupakan salah satu contoh obat yang bekerja dengan inhibisi asam nukleat. Rifampin menghambat pertumbuhan bakteri yang berkaitan pada RNA polymerase dependen DNA bakteri (Brooks, 2005:353-362). Dan cara yang keempat yaitu inhibisi sintesis protein, pada sintesa mikroba normal pesan mRNA secara simultan dibaca oleh beberapa ribosom yang bentuknya memanjang disepanjang untai mRNA (Brooks, *et al.* 2005:353-362).

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.3 Kerangka konsep penelitian

2.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) memiliki daya antibakteri terhadap *S. mutans*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini berupa *experimental laboratories*. Rancangan penelitian ini adalah (*The Post test Only Control Group Design*), yaitu dilakukan dengan pengukuran terhadap variabel yang diteliti setelah dilakukan perlakuan, kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2005).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Biosains Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember dan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica Batu pada bulan Maret 2015.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus (L). Merr.*) 100%, 50%, dan 25%. Variabel terikat pada penelitian ini adalah daya hambat ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus (L). Merr.*) terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans*. Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah metode dan cara kerja ekstrak daun katuk, dan suspensi *S. mutans*.

3.4 Definisi Operasional Variabel

3.4.1 Kriteria Daun katuk

Daun katuk adalah daun yang utuh dan masih segar berwarna hijau tua dengan panjang 2-3 cm dan baru dipetik dari perkebunan Balai Materia Medica, Batu.

3.4.2 Ekstrak Daun Katuk

Pada penelitian ini ekstrak daun katuk adalah ekstrak yang dibuat dari 1kg daun katuk yang dikeringkan, dan dihaluskan hingga menjadi serbuk (simplisia) kemudian ditimbang diperoleh 225 gram, setelah itu dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam lalu disaring. Filtrat yang diperoleh dilakukan remaserasi dengan pelarut dan jumlah yang sama selama 24 jam kemudian disaring lagi. Selanjutnya maserat yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40-50°C selama 4,5 jam sampai diperoleh ekstrak pekat atau kental dengan konsentrasi 100% (Depkes RI, 2000:11).

3.4.2 Daya Antibakteri

Daya antibakteri adalah zat yang dapat membunuh bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan dapat dilihat dari terbentuknya daerah yang jernih sekitar sumuran pada tiap konsentrasi ekstrak daun katuk. Pengukurannya dilakukan di daerah yang jernih dengan cara mengukur diameter daerah yang jernih sekitar sumuran dengan menggunakan jangka sorong (Joshi, *et al.*, 2009:57).

3.4.3 *S. mutans*

Dalam penelitian ini *S. mutans* yang digunakan didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. *S. mutans* berada dalam media BHI-B kemudian dijadikan bentuk suspensi terlebih dahulu agar memudahkan saat penggunaan. *S. mutans* memiliki bentuk kokus, formasi rantai panjang, tumbuh pada suasana asam, dan dapat tumbuh pada suhu 18-40 °C (Lee, *et al.*, 2006:67).

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Besar Sampel

Besar sampel diperoleh dari perhitungan rumus Steel dan Torrie (1995:145-147). Diperoleh 8 untuk setiap kelompok. Perhitungan dapat dilihat pada lampiran A.

3.5.2 Pengelompokan Sampel

Sampel penelitian ini dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan sebagai berikut :

- a. Kelompok K+ : *chlorhexdine* 0,2% (kontrol positif)
- b. Kelompok K- : aquades steril (kontrol negatif)
- c. Kelompok E100 : ekstrak daun katuk konsentrasi 100%
- d. Kelompok E50 : ekstrak daun katuk konsentrasi 50%
- e. Kelompok E25 : ekstrak daun katuk konsentrasi 25%

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat

- a. Blender
- b. Autoclave (Memert, D06059, Germany)
- c. *Petridish* tidak bersekat
- d. Tabung reaksi (Pyrex, Japan)
- e. Jangka sorong dengan derajat ketelitian 0,5mm (Inoki, Japan)
- f. Syringe (One-Med, Indonesia)
- g. Spidol
- h. Ose
- i. Tabung *Erlenmeyer* (Schott-Duran, Germany)
- j. Spatula kaca
- k. Kompor listrik (Maspion, Indonesia)
- l. Spektrofotometer (Milton Roy, Germany)
- m. *Laminar flow* (Super Clean Bench, HF-100, Korea)
- n. *Rotary evaporator* (Heidolph, G3, Germany)

- o. *Incubator* (WTC Binder, 17053099003100, Germany)
- p. *Desicator* (Vakuumfest-Scoot, Germany)
- q. Timbangan/neraca (Ohaus, 311, Indonesia)
- r. Kertas saring (Whatman, No. 42, UK)
- s. Toples bertutup
- t. Gigaskrin
- u. Mikropipet (Eppendorf, Germany)
- v. *Thermolyne* (Maxi, Mix II, Dubuque, Iowa, USA)
- w. Kompor listrik (Maspion, Indonesia)

3.6.2 Bahan

- a. Etanol 96%
- b. Alkohol 70%
- c. BHI-A (*Brain Heart Infusion Agar*) (Merk, Germany)
- d. BHI-B (*Brain Heart Infusion Broth*) (Merk, Germany)
- e. *S. Mutans* (Strain CJ2, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember)
- f. Aquades steril (PT Aditama Raya Famindo, Surabaya-Indonesia)
- g. Daun Katuk (*Sauropus androgynus (L). Merr.*) (Balai Materia Medica Batu, Malang)
- h. Obat Kumur *Chlorhexidine gluconate* 0,2 % (Minosep, Indonesia)

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Tahap Persiapan

- a. Sterilisasi Alat

Semua alat yang terbuat dari kaca dibersihkan dan terlebih dahulu dalam autoclave selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Sedangkan alat yang terbuat dari

plastik dicuci bersih dan dikeringkan kemudian disemprotkan alkohol 70% dan dibersihkan dengan tissue.

b. Identifikasi Tanaman Katuk

Sebelum digunakan dalam penelitian, tanaman katuk terlebih dahulu dilakukan identifikasi di Balai Materia Medika, Batu, Malang. Hasil dari identifikasi diperoleh bahwa tanaman katuk bernama latin *Sauropus androgynus* (L.) Merr.), (Lampiran G.1).

c. Pembuatan Ekstrak Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.)

Pembuatan ekstrak daun katuk dilakukan di Laboratorium Fitokimia UPT Materia Medica, Batu (Lampiran G.3), dengan tahapan sebagai berikut:

- 1) Daun katuk segar 1kg dicuci dengan air bersih kemudian langsung dikeringkan tak langsung yaitu dengan menggunakan bantuan sinar matahari untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam daun katuk (lihat gambar 3.2). Lalu daun katuk yang sudah kering ditimbang dan diperoleh berat sebanyak 450 gram.



(a)

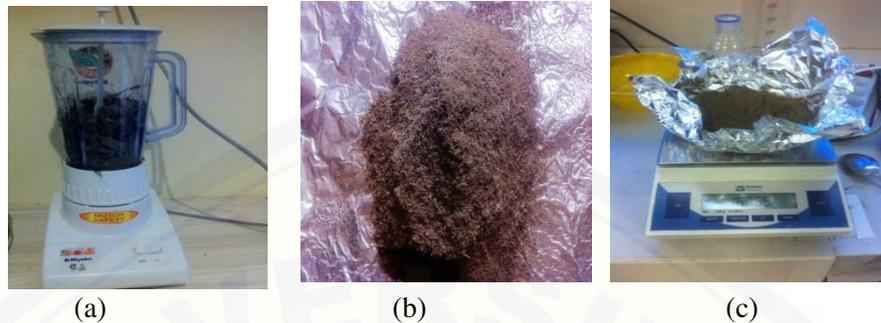


(b)

Gambar 3.1 (a) Daun katuk segar, dan (b) daun katuk setelah dikeringkan

(Sumber: Foto pribadi)

- 2) Daun katuk kering dihaluskan dengan menggunakan blender hingga menjadi bubuk (lihat gambar 3.2 (a) dan (b)). Bubuk daun katuk diayak menggunakan ayakan dan ditimbang dengan menggunakan neraca timbang (lihat gambar 3.2 (c)).



Gambar 3.2 (a) proses penghalusan daun katuk, (b) simplisia halus sesudah diayak, dan (c) penimbangan simplisia halus daun katuk. (Sumber: Foto pribadi)

- 3) Cara ekstrak daun katuk dari simplisia halus daun katuk ditimbang diperoleh sebanyak 225 gram, kemudian direndam dengan etanol 96% sebanyak 2250 ml sesuai perbandingan 1:10 b/v. Perendaman selama 24 jam di toples tertutup dan diaduk menggunakan *shaker bath*. (lihat gambar 3.3).

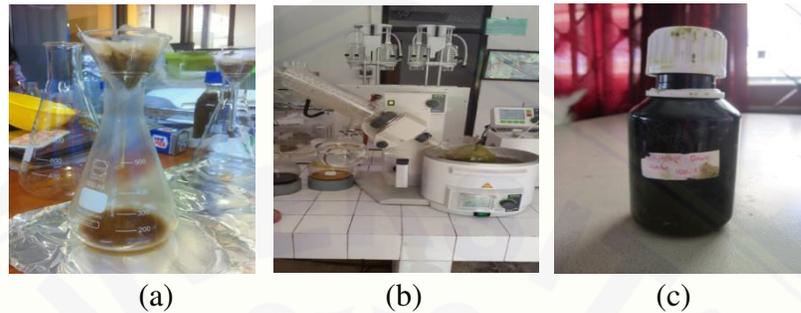


Gambar 3.3 Rendaman simplisia halus daun katuk dengan etanol 96%.

(Sumber: Foto pribadi)

- 4) Rendaman simplisia daun katuk disaring menggunakan kertas saring dengan bantuan *corong buncher* dan tampung dalam tabung *erlenmeyer* (lihat gambar 3.4 a), kemudian filtrat dari rendaman tersebut direndam lagi dengan etanol seperti proses sebelumnya (Menkes RI, 2009:175). Setelah selesai, dilakukan penguapan dengan *rotary evaporator* (lihat gambar 3.4 b) selama 4,5 jam dan diperoleh ekstrak kental daun katuk 106 gram dengan konsentrasi 100% (lihat

pada gambar 3.4 c). Hasil ekstrak daun katuk apabila tidak digunakan langsung dapat disimpan dalam lemari es.



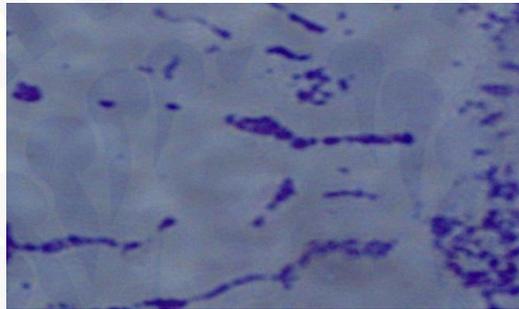
Gambar 3.4 (a) proses penyaringan, (b) proses penguapan dengan *rotary evaporator*, dan (c) hasil ekstrak daun katuk. (Sumber: Foto pribadi).

d. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan pada bakteri *S. mutans* terlebih dahulu di Laboratorium Mikrobiologi FKG Universitas Jember untuk memastikan bakteri tersebut tidak terkontaminasi saat dilakukan penelitian (Lampiran G.2). *S. mutans* yang digunakan adalah *S. mutans* murni. Tahapan pewarnaan adalah sebagai berikut :

- a. Gelas obyek yang sudah bersih dan sudah dipulas dengan *Streptococcus mutans* yang akan diperiksa dan difiksasi diatas api bunsen dan siap untuk dilakukan pewarnaan.
- b. Pada sediaan dituangkan zat warna *carbol gentian violet* (I) selama 3 menit.
- c. *Carbol gentian violet* dibuang dengan air mengalir dan dituangi larutan lugol (*mordant*) selama 1 menit.
- d. *Lugol* dibuang dengan disiram dengan air mengalir lalu sediaan dilunturkan dengan *selective decolorizer* (alkohol 96%) selama 1 menit. Dalam prakteknya biasanya diambil pegangan sebagai berikut yaitu apabila zat warna pertama sudah tidak terlihat lagi menempel pada gelas objek, maka pelunturan dianggap telah cukup.

- e. Sediaan disiram dengan air selama 1 menit untuk menghilangkan sisa bahan pelunturan yang mungkin masih tertinggal pada sediaan.
- f. Kemudian sediaan diwarnai dengan *safranin* atau *fuchsin* (II) selama 2 menit lalu sediaan disiram dengan air selama waktu yang diperlukan untuk menghilangkan sisa – sisa zat warna, lalu dikeringkan dan siap dilihat dibawah mikroskop dengan ditutup menggunakan *cover glass* atau *deck glass* dan diberi minyak imersi (Gunadi *et al.*, 2012:22).

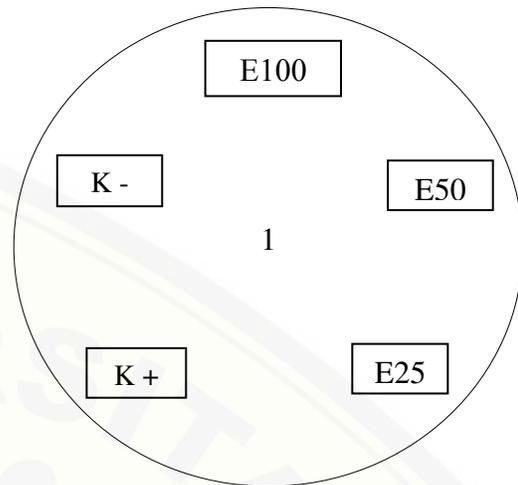


Gambar 3.5 Hasil pewarnaan Gram pada *S. mutans*, terlihat berbentuk kokus formasi rantai panjang berwarna ungu (perbesaran 1000 kali). (Sumber: foto pribadi)

e. Persiapan media

1) Persiapan *petridish*

Menyiapkan *petridish* bersih dan steril sebanyak dengan besar sampel yang digunakan yaitu berjumlah 8 buah di dalam *laminar flow*. Masing – masing *petridish* diberi nomor sesuai dengan jumlah *petridish* (lihat pada gambar 3.5).



Keterangan:

- 1 : Nomor urut *petridish*
- K+ : Kode kontrol positif
- K- : Kode kontrol negatif
- E100 : Kode ekstrak daun katuk 100%
- E50 : Kode ekstrak daun katuk 50%
- E25 : Kode ekstrak daun katuk 25%

Gambar 3.6 Pemberian label pada bagian bawah *petridish*

(Sumber: Foto pribadi)

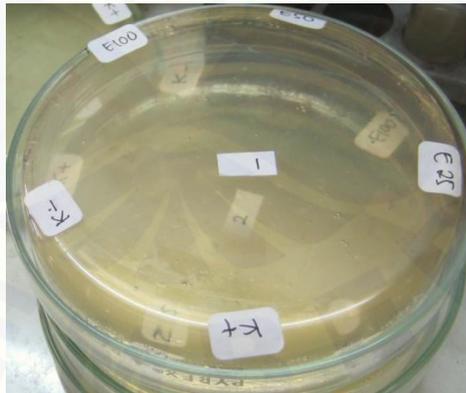
2) Persiapan Media Cair BHI-B dan Inokulum *S. mutans*

Pembuatan BHI-B dengan cara mencampur 3,7 gram BHI-B dengan 100ml aquades steril kemudian diaduk hingga homogen dan dipanaskan hingga mendidih (Neogen, 2010:1). Larutan BHI-B tersebut disterilkan dalam autoclave. Pembuatan inokulum *S. mutans* dengan cara mencampur 4ml larutan BHI-B steril yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan 1 ose isolat *S. mutans*. Perlakuan yang dilakukan dengan melewatkannya diatas bunsen yang menyala untuk menghindari kontaminasi. Tabung reaksi ditutup dengan kapas dan dimasukkan ke dalam *desicator* dan diinkubasi dalam *incubator* dengan suhu 37 °C selama 24 jam (Rahim dan Khan, 2006:118). Pertumbuhan bakteri *S. mutans* ditandai dengan adanya kekeruhan pada media. Setelah 24 jam, inokulum *S. mutans* dalam tabung reaksi

disesuaikan kekeruhannya dengan standar *McFarland* 0,5 menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625nm (Adegbolagun *et, al.* dalam Monalisa *et, al.*, 2011:15).

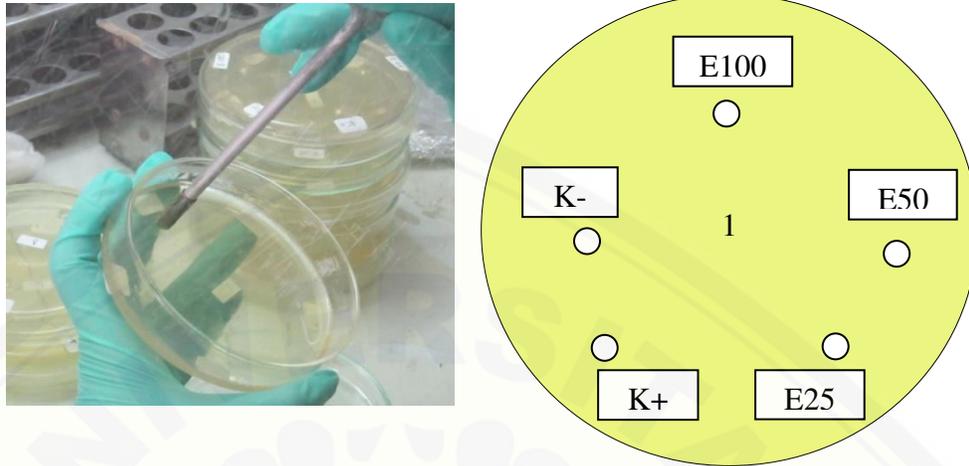
3) Pembuatan media BHI-A dan pemberian inokulum *S. mutans*

BHI-A merupakan media penyubur dalam bentuk agar untuk pertumbuhan bakteri ketika suspensi *S. mutans* diinokulasi. Pertama diawali dengan membuat media agar dengan mencampur 10,4 gram BHI-A dan 200ml aquades steril dalam tabung *Erlenmeyer* kemudian dipanaskan sambil diaduk menggunakan spatula kaca dan dididihkan selama 1 menit hingga homogen lalu disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121 ° C selama 15menit (Neogen, 2011:1). Menurut Papagianni *et al.*, (2006:10), setelah media sudah hangat dengan suhu 40-50 °C dituangkan ke dalam 8 *petridish* steril masing – masing sebanyak 25 ml dengan ketebalan 6 mm, lalu menginokulasi 0,5 ml suspensi bakteri *S. mutans* pada media BHI-A dan diratakan dengan gigaskrin kemudian dibiarkan hingga media memadat (lihat gambar 3.7).



Gambar 3.7 Media BHI-A yang sudah diinokulasi *S. mutans*.(Sumber: Foto pribadi)

4) Pembuatan lima sumuran setelah media yang sudah diinokulasi *S. mutans* memadat menggunakan *sterile cork borer* dengan diameter 5mm (Sudha *et al.*, 2013:394) (lihat gambar 3.8).

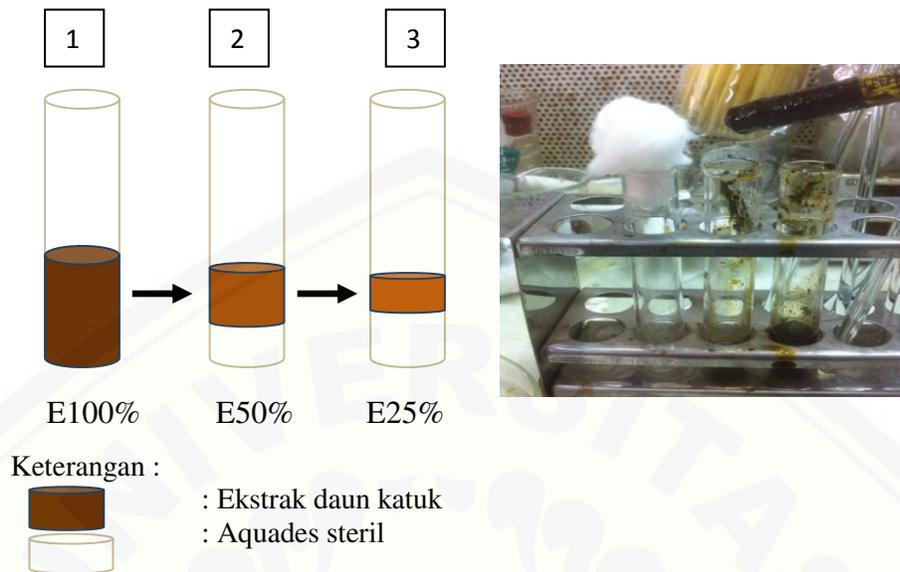


Gambar 3.8 Pembuatan sumuran pada media BHI-A yang sudah memadat (Sumber: Foto pribadi)

5) Pengenceran Ekstrak daun katuk

Pengenceran dilakukan di dalam *laminar flow* menggunakan *serial dilution* dengan syringe dan dimasukkan dalam tabung reaksi (lihat gambar 3.8). Konsentrasi ekstrak daun katuk yang digunakan adalah 100%, 50%, dan 25%. Pengenceran ekstrak daun katuk sebagai berikut:

1. Ekstrak daun katuk 100% diambil sebanyak 2ml kemudian diletakkan pada tabung reaksi.
2. Ekstrak daun katuk 50% diperoleh dari 1ml ekstrak 100% ditambah 1ml aquades steril lalu dihomogenkan menggunakan *thermolyne*.
3. Ekstrak daun katuk 25% diperoleh dari 1ml ekstrak 50% ditambah dengan 1ml aquades steril lalu dihomogenkan menggunakan *thermolyne*.



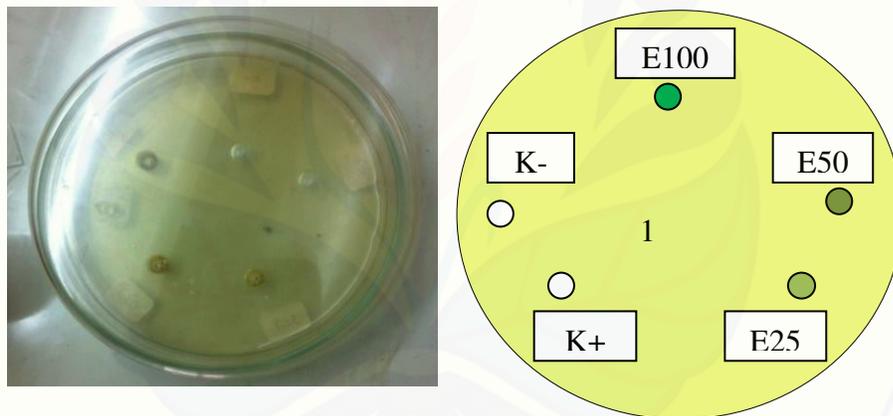
Gambar 3.9 Pengenceran ekstrak daun katuk. (Sumber: Foto pribadi)

3.7.2 Tahap Perlakuan

Metode pengujian yang digunakan adalah metode difusi sumuran. Semua perlakuan dilakukan di dalam *laminar flow* untuk menghindari kontaminasi. Pada tahapan ini terjadi dari beberapa bagian antara lain:

- a. Setelah pembuatan lima sumuran pada petridish selesai, dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun katuk kontrol positif, kontrol negatif, dan 100%.
 - 1) Sumuran dengan keterangan label K+ diisi dengan *chlorhexidine* sebanyak 15 μ L menggunakan mikropipet tip 1, dari *petridish* nomor 1 sampai 8. (lihat gambar 3.10-).
 - 2) Sumuran dengan keterangan label K- diisi dengan aquades steril sebanyak 15 μ L menggunakan mikropipet tip 2, dari *petridish* nomor 1 hingga nomor 8. (lihat gambar 3.10).
 - 3) Sumuran dengan label E100 diisi dengan ekstrak daun katuk konsentrasi 100% sebanyak 15 μ L menggunakan mikropipet tip 3 (Sudha *et al.*, 2013:394), dari *petridish* nomor 1 hingga 8. (lihat gambar 3.10).

- 4) Sumuran dengan label E50 diisi dengan ekstrak daun katuk konsentrasi 100% sebanyak 15 μ L menggunakan mikropipet tip 4 dari *petridish* nomor 1 sampai dengan 8 (lihat gambar 3.10).
- 5) Sumuran dengan label E25 diisi dengan ekstrak daun katuk konsentrasi 100% sebanyak 15 μ L menggunakan mikropipet tip 5 dari *petridish* nomor 1 sampai dengan 8 (lihat gambar 3.10). Selanjutnya delapan *petridish* yang telah diberi perlakuan dimasukkan kedalam *desicator* guna mendapatkan suasana fakultatif anaerob. *Petridish* ditaruh dalam posisi terbalik untuk mencegah terjadinya tetesan uap air pada permukaan media agar. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

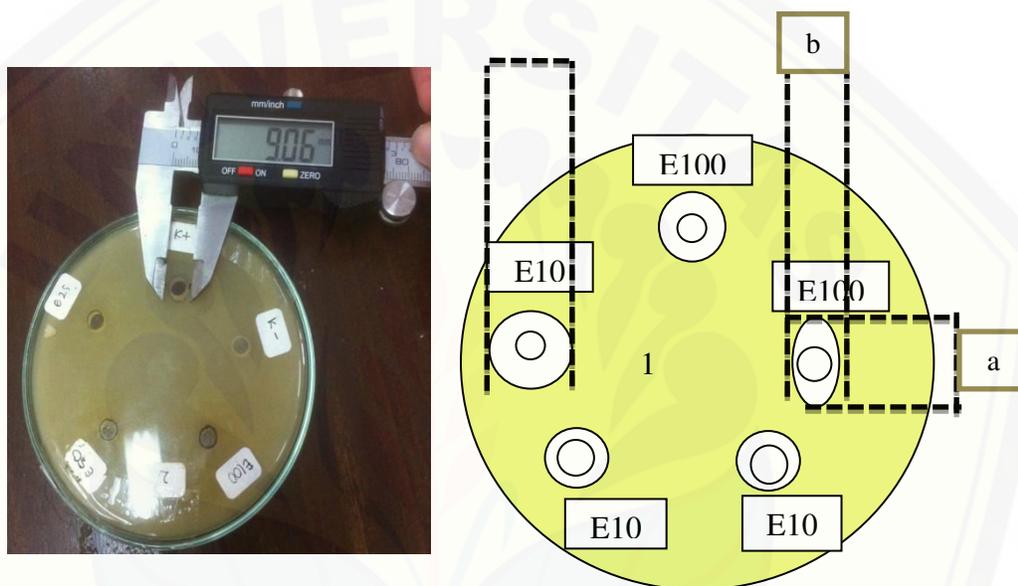


Gambar 3.9 Pemberian ekstrak daun katuk, kontrol positif, dan kontrol negatif.

3.7.3 Tahap Pengukuran

- a. Setelah diinkubasi selama 24 jam kemudian pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong pada daerah jernih disekitar sumuran.
- b. Pengukuran dilakukan oleh 3 orang dan diambil rata-rata.
- c. Untuk pengukuran pada zona hambat berbentuk bulat, pengukuran dilakukan dengan mengukur diameter dari zona hambat yang diamati dengan jangka sorong

dengan satuan millimeter (Joshi, *et al.*, 2009:57). Jika terdapat daerah jernih berbentuk lonjong, maka dilakukan pengukuran diameter yang panjang (misalnya a) dan diameter yang pendek (misalnya b), selanjutnya keduanya dijumlah dan dibagi dua. Jadi diameter zona hambat = $(a+b) : 2$ (Majidah, 2014:36). Semakin besar zona hambat menunjukkan semakin besar juga daya antibakteri dari ekstrak daun katuk terhadap *S. mutans*.



Keterangan:

a = diameter zona hambat panjang

b = diameter zona hambat pendek

○ = zona hambat

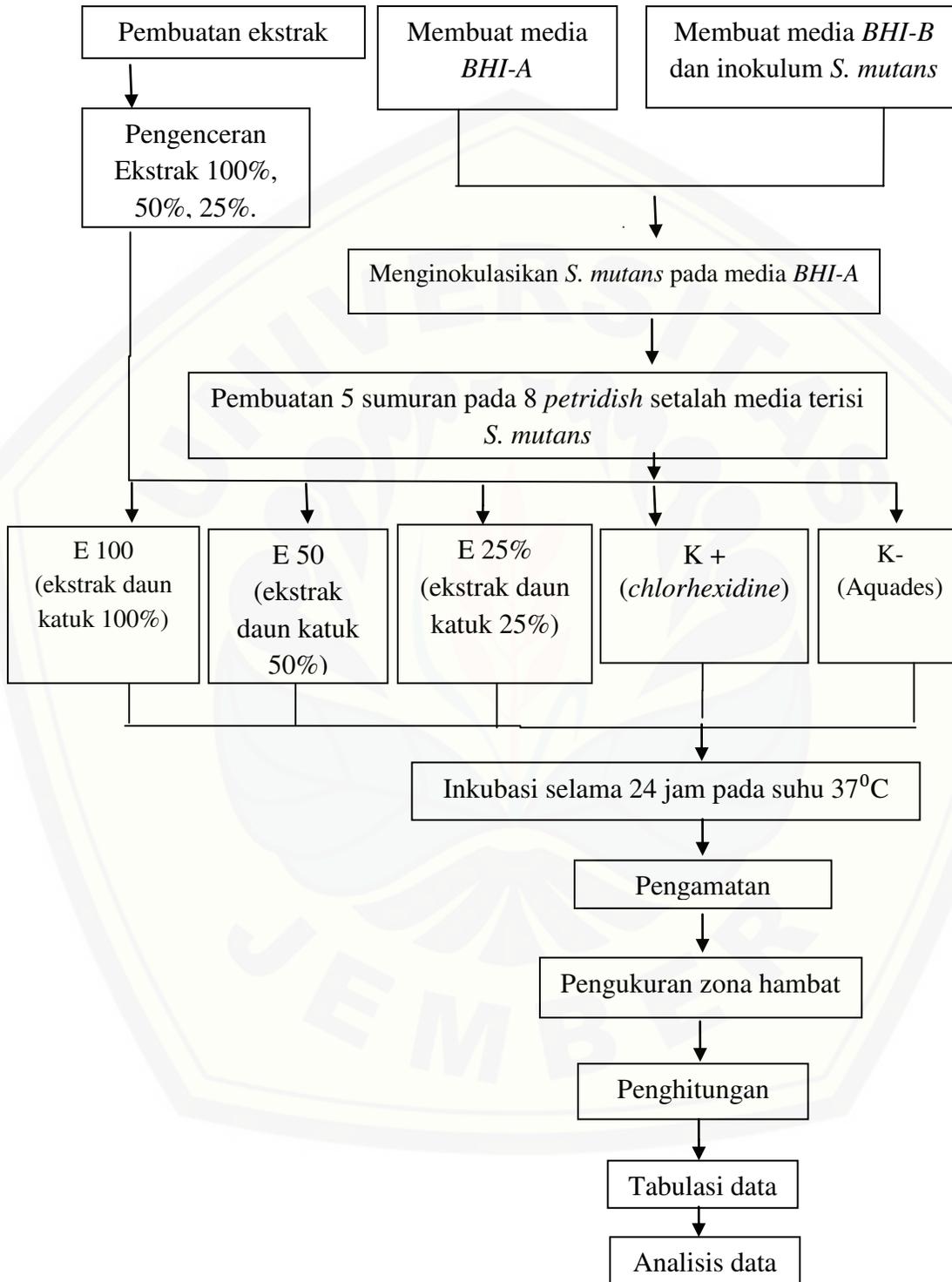
○ = lubang sumuran

Gambar 3.11 Pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong.
(Sumber: Foto pribadi)

3.8 Analisis Data

Hasil penelitian dilakukan analisa data yang sudah diperoleh kemudian dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji homogenitas menggunakan *Levene Test*. Apabila kedua uji menunjukkan data normal dan homogen ($p > 0,05$) maka dilakukan uji statistik parametrik dengan menggunakan uji *Oneway Anova* dan dilanjutkan uji *LSD* untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan pada tiap kelompok. Tetapi jika datanya tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen dilanjutkan dengan uji statistik non parametrik menggunakan uji *Kruskal Wallis* (Yani *et al.*, 2011:41)

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.12 Alur penelitian