



**DAYA ANTIBAKTERI INFUSA DAUN ASAM JAWA
(*Tamarindus indica* Linn) 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

**Anggi Faradiba
NIM 111610101080**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW, atas segala rahmat dan karunia yang begitu besar sehingga saya mampu menyelesaikan skripsi ini.
2. Keluarga tercinta, Bapak, Mamah dan kakak-kakak. Terimakasih atas kesabaran, kasih sayang, dukungan, perhatian, doa dan motivasi yang tiada batas untuk saya dalam menyelesaikan pendidikan di kedokteran gigi.
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi. Terima kasih atas segala ilmu dan didikan yang telah diberikan selama ini.
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang selalu saya banggakan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan menambah referensi bagi ilmu pengetahuan khususnya di bidang Mikrobiologi.

MOTO

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya
(Q.S. Al Baqarah : 286) *)

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan
(Q.S. Al Insyirah : 6) *)

Maka nikmat Tuhanmu yang manakah yang kamu dustakan?
(Q.S. Ar Rahman : 13) *)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. Al-'Aliyy Al-Qur'an dan Terjemahnya. Bandung: C.V. Diponegoro.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Anggi Faradiba

NIM : 111610101080

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

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

Jember, 27 November 2015

Yang menyatakan,

Anggi Faradiba

NIM 111610101080

SKRIPSI

DAYA ANTIBAKTERI INFUSA DAUN ASAM JAWA

(*Tamarindus indica* Linn) TERHADAP

Streptococcus mutans

Oleh

Anggi Faradiba

NIM 111610101080

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : drg. Achmad Gunadi, M.S., Ph.D

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Depi Praharani, M.Kes.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Daya Antibakteri Infusa Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* Linn) terhadap *Streptococcus mutans*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal : Jumat, 27 November 2015

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

drg. Melok Aris W, M.Kes., Sp.Perio.
NIP 197104092005012002

Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes.
NIP 197102041998022002

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Achmad Gunadi, M.S., Ph.D.
NIP 195606121983031002

drg. Depi Praharani, M.Kes.
NIP 196801221997022001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

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

RINGKASAN

Daya Antibakteri Infusa Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* Linn) terhadap *Streptococcus mutans*; Anggi Faradiba, 111610101080; 2015: 54 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Karies gigi merupakan penyakit jaringan keras rongga mulut yang disebabkan oleh interaksi dari beberapa faktor yaitu inang, mikroorganisme, substrat dan waktu. Salah satu mikroorganisme rongga mulut yang berperan dalam terjadinya karies gigi adalah *Streptococcus mutans*.

Infeksi yang disebabkan oleh bakteri *S. mutans* dapat diatasi dengan penggunaan antibakteri baik alami maupun sintetis. Antibakteri sintetis dapat menimbulkan efek samping pada penggunaan jangka panjang oleh karena itu perlu dilakukan penelitian dalam usaha mencari bahan alami yang dapat digunakan sebagai antibakteri guna meminimalisir efek samping yang ditimbulkan.

Daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.) adalah salah satu tanaman obat yang telah diketahui mengandung senyawa antibakteri seperti flavonoid, saponin, alkaloid, vitamin C, *chlorine* dan tanin. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa ekstrak daun asam jawa terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Eschericia coli*, *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus*. Tidak menutup kemungkinan infusa daun asam jawa juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah infusa daun asam jawa memiliki daya antibakteri terhadap *S. mutans* dan apabila terbukti berapakah konsentrasi paling efektif dari infusa daun asam jawa dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans*.

Jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan *the post test only control group design*. Sampel pada penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok kontrol yaitu kelompok kontrol positif (K+) dan kelompok kontrol negatif (K-), serta 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok infusa daun asam jawa 100% (A100), kelompok infusa

daun asam jawa 50% (A50) dan kelompok infusa daun asam jawa 25% (A25) dengan jumlah sampel untuk setiap kelompok sebanyak 5. Uji daya antibakteri menggunakan metode difusi cakram (*disc diffusion method*), dimana daya antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambat yaitu daerah jernih di sekeliling cakram kertas yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri.

Hasil dari analisis data menunjukkan bahwa data penelitian normal dan homogen. Hasil uji *one way* ANOVA didapatkan signifikansi 0,00 yang berarti ada perbedaan bermakna pada masing-masing kelompok. Begitu juga dengan hasil uji LSD didapatkan signifikansi $<0,05$ yang artinya ada perbedaan bermakna antar kelompok pada penelitian ini. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa infusa daun asam jawa memiliki potensi sebagai agen antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *S. mutans* dengan diameter zona hambat yang terbentuk paling besar adalah infusa daun asam jawa 100%, kemudian infusa daun asam jawa 50% dan terkecil adalah infusa daun asam jawa 25%.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa infusa daun asam jawa mempunyai daya antibakteri terhadap *S. mutans* dan konsentrasi paling efektif dari infusa daun asam jawa untuk menghambat pertumbuhan *S. mutans* adalah infusa daun asam jawa konsentrasi 100%.

PRAKATA

Puji dan syukur saya ucapkan kepada Allah SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Daya Antibakteri Infusa Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* Linn) terhadap *S. mutans*”. Penulisan skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. Achmad Gunadi, M.S., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Depi Praharani, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, perhatian, kesabaran dan dedikasinya dari awal penyusunan sampai terselesaikannya skripsi ini;
2. drg. Tantin Ermawati, M.Kes. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis mulai dari awal masa perkuliahan hingga penulisan skripsi ini selesai;
3. drg. Melok Aris W., M.Kes., Sp.Perio selaku Dosen Penguji Ketua dan Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes. selaku Dosen Penguji Anggota atas saran dan kritik untuk kesempurnaan skripsi ini;
4. Seluruh dosen/staf pengajar di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember atas segala ilmu dan didikan yang telah diberikan selama ini;
5. Seluruh teknisi di Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Dental Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan Laboratorium *Bioscience* Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember yang secara langsung maupun tidak membantu penulis dalam pengerjaan skripsi;

6. Bapak Suhadi, Ibu Sudarti, Kak Fahrauk dan Kak Gardiani yang telah memberikan dukungan, dorongan dan doa yang tiada henti demi terselesaikannya skripsi ini;
7. Teman-teman seperjuangan Dian, Deasy, Ita, Maharja, Haris, yang telah mendukung, menyemangati dan memberikan pertolongan selama penelitian dan penyelesaian skripsi;
8. Sahabat-sahabat Hera, Sarah, Camila yang telah memberikan motivasi dan perhatiannya;
9. Teman-teman KKN Sruni Sasa, Vina, Meiga dan lainnya terima kasih atas semangat dan perhatiannya;
10. Teman-teman FKG UNEJ angkatan 2011 untuk semua bantuan, kerjasama dan kebersamaan selama menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
11. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan dengan berlipat ganda. Penulis juga menyadari masih banyak kekurangan dan ketidaksempurnaan dalam penulisan skripsi ini. Untuk itu segala kritik dan saran dari semua pihak sangat diharapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 27 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
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 Tanaman Asam Jawa	4
2.1.1 Morfologi Tanaman Asam Jawa	4
2.1.2 Kandungan Tanaman Asam Jawa	6
2.1.3 Manfaat Tanaman Asam Jawa	8
2.2 <i>Streptococcus mutans</i>	8
2.2.1 Karakteristik, Patogenitas dan Struktur Antigen <i>Streptococcus mutans</i>	9
2.3 Daya Antibakteri	11

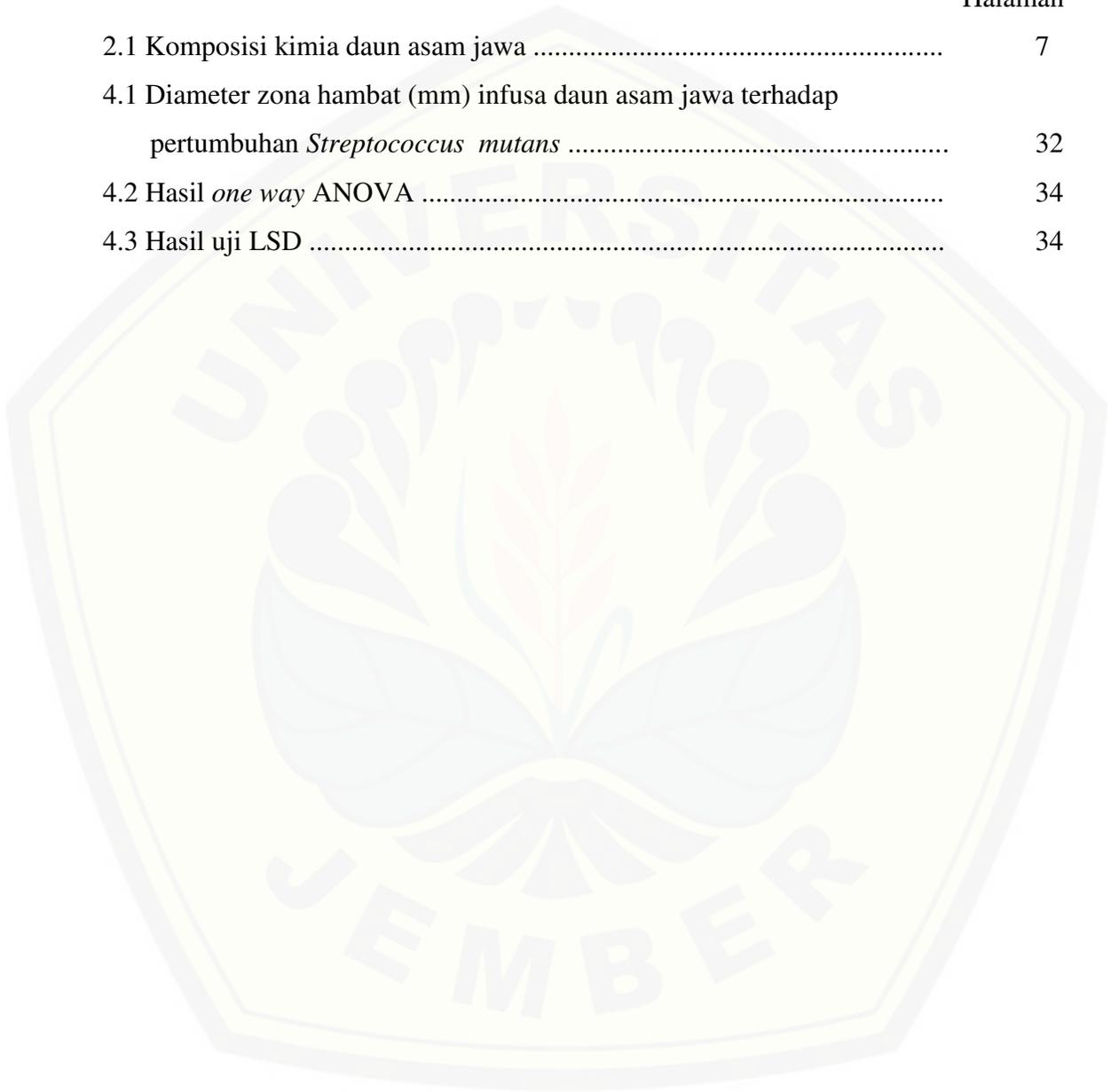
2.3.1 Mekanisme Kerja Antibakteri	11
2.3.2 Uji Daya Antibakteri	13
2.4 Metode Ekstraksi Simplisia	15
2.5 Daya Antibakteri Infusa Daun Asam Jawa	17
2.6 Hipotesis	20
2.7 Kerangka Konsep Penelitian	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Jenis Penelitian	21
3.2 Rancangan Penelitian	21
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.4 Identifikasi Variabel Penelitian	21
3.5 Definisi Operasional Penelitian	22
3.6 Sampel Penelitian	22
3.6.1 Jumlah Sampel Penelitian	22
3.6.2 Pengelompokan Sampel Penelitian	23
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	23
3.7.1 Alat Penelitian	23
3.7.2 Bahan Penelitian	24
3.8 Prosedur Penelitian	24
3.8.1 Tahap Persiapan	24
3.8.2 Uji Daya Antibakteri	27
3.9 Analisis Data	29
3.10 Alur Penelitian	30
BAB 4. Hasil dan Pembahasan	31
4.1 Hasil Uji Daya Antibakteri Infusa Daun Asam Jawa	31
4.2 Analisis Data	33
4.3 Pembahasan	34
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan	38

5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	45



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi kimia daun asam jawa	7
4.1 Diameter zona hambat (mm) infusa daun asam jawa terhadap pertumbuhan <i>Streptococcus mutans</i>	32
4.2 Hasil <i>one way</i> ANOVA	34
4.3 Hasil uji LSD	34



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Pohon asam jawa	5
2.2 Daun asam jawa	5
2.3 Buah asam jawa	6
2.4 <i>Streptococcus mutans</i>	10
2.5 Struktur dinding sel <i>Streptococcus mutans</i>	11
3.1 Pembagian daerah dan pemberian kertas label pada <i>petridish</i>	28
4.2 Zona hambat infusa daun asam jawa terhadap <i>Streptococcus mutans</i> ...	31
4.3 Histogram rata-rata diameter zona hambat pertumbuhan <i>Streptococcus mutans</i>	34

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit gigi dan mulut dapat terjadi pada jaringan keras maupun jaringan lunak rongga mulut. Penyakit jaringan keras rongga mulut yang sering terjadi pada masyarakat adalah karies gigi. Penyakit ini rata-rata di dunia menyerang 60-90% anak-anak maupun orang dewasa (*World Health Organization*, 2003). Prevalensi karies di Indonesia sendiri sebanyak 53,2 % yaitu kurang lebih 93.998.727 jiwa yang menderita karies gigi (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, 2013).

Karies gigi disebabkan oleh interaksi dari berbagai faktor, seperti faktor inang (gigi dan saliva), mikroorganisme, substrat (makanan) serta waktu sebagai faktor tambahan. Mikroorganisme penyebab karies adalah bakteri dari jenis *Streptococcus* dan *Lactobacillus*. Namun dari berbagai penelitian dilaporkan bahwa *Streptococcus mutans* merupakan agen penyebab karies yang paling sering ditemukan (Graham & Hume, 2005).

Berbagai macam tindakan pencegahan karies gigi telah dikembangkan untuk mengendalikan tingkat prevalensi karies gigi yang terus meningkat di Indonesia. Salah satu cara pencegahan karies gigi adalah kontrol plak. Kontrol plak gigi dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu mekanis dan kimiawi (McDonald & Avery, 2000). Tindakan pembuangan plak secara mekanis akan memberikan hasil yang jauh lebih efektif jika dilengkapi dengan penggunaan bahan aktif yang mempunyai daya antibakteri terutama untuk menekan pertumbuhan dan metabolisme *S. mutans* (Pratiwi, 2005). Bahan aktif tersebut dapat diformulasikan ke dalam pasta gigi, *tooth powder*, obat kumur dan gel (Riyanti dkk., 2010).

Bahan aktif yang mempunyai daya antibakteri dapat ditemukan dalam obat sintesis maupun tanaman obat. Akan tetapi obat sintesis dapat memberikan efek

samping jika digunakan dalam jangka waktu panjang. Masyarakat kini semakin banyak yang memilih menggunakan bahan alami yaitu tanaman obat karena efek sampingnya relatif kecil jika digunakan secara tepat (Katno & Pramono, 2006).

Tanaman asam jawa (*Tamarindus indica* Linn) merupakan salah satu tanaman yang banyak dibudidayakan di negara tropis sehingga dapat dengan mudah ditemukan termasuk di Indonesia. Tanaman ini biasanya digunakan untuk bumbu dapur tetapi sudah banyak masyarakat yang memanfaatkannya sebagai bahan pengobatan tradisional. Bagian tanaman asam jawa yang biasa digunakan untuk pengobatan antara lain adalah daun, kulit batang, daging buah dan biji (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

Daun asam jawa memiliki banyak kandungan zat yang sangat berguna untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit dan juga dapat menghambat aktivitas bakteri dalam tubuh. Getah daun memiliki khasiat diuretik. Daun memiliki khasiat kholagogik, laksatif dan bersama buahnya digunakan untuk konstipasi dan hemoroid (William, 2006). Dekokta daun digunakan untuk mengatasi batuk dan demam (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menguji daya antibakteri daun asam jawa. Hasil penelitian oleh Puspodewi dkk. (2015) menunjukkan bahwa daun asam jawa yang diekstraksi dengan metode maserasi maupun infusa memiliki daya antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Penelitian yang dilakukan oleh Suryadi dkk. (2015) juga membuktikan bahwa infusa daun asam jawa memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*. Ekstrak etanol daun asam jawa konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% juga terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Multazami, 2012).

Berdasarkan uraian di atas dapat diketahui bahwa penelitian tentang uji daya antibakteri infusa daun asam jawa terhadap bakteri *S. mutans* belum pernah diteliti. Hal ini yang mendorong penulis untuk melakukan penelitian tersebut, dimana daun asam jawa yang digunakan dalam bentuk infusa karena sediaan ini pembuatan dan aplikasinya mudah (Sulistiyawati & Sri, 2009).

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang dapat dirumuskan adalah sebagai berikut.

1. Apakah infusa daun asam jawa memiliki daya antibakteri terhadap *S. mutans*?
2. Bila memiliki daya antibakteri terhadap *S. mutans* berapakah konsentrasi infusa yang paling efektif?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah sebagai berikut.

1. Untuk mengetahui daya antibakteri infusa daun asam jawa terhadap *S. mutans*.
2. Untuk mengetahui konsentrasi paling efektif infusa daun asam jawa sebagai antibakteri terhadap *S. mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai berikut.

1. Sebagai tambahan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat daun asam jawa sebagai bahan obat tradisional untuk mencegah terjadinya infeksi bakteri *S. mutans*.
2. Sebagai acuan untuk penelitian lebih lanjut tentang pengaruh daun asam jawa terhadap mikroflora lain yang dapat menyebabkan kelainan di rongga mulut apabila penelitian ini terbukti berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Asam Jawa

Asam jawa merupakan salah satu jenis tanaman buah yang banyak tumbuh di Indonesia. Asam jawa dapat tumbuh pada berbagai kondisi tanah dan iklim, di tanah pasir hingga tanah liat, pada ketinggian yang rendah hingga tinggi, dengan curah hujan merata atau tempat dengan musim kemarau yang panjang. Sistem perakaran yang panjang membuat tanaman ini tahan terhadap kekeringan dan terpaan angin kencang (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

Sistematika tumbuhan (taksonomi) asam jawa diklasifikasikan sebagai berikut (Rukmana, 2005).

Divisi	: <i>Tracheophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Subkelas	: <i>Rosanae</i>
Bangsa	: <i>Fabales</i>
Suku	: <i>Fabaceae</i>
Marga	: <i>Tamarindus</i> Linn.
Jenis	: <i>Tamarindus indica</i> Linn.

2.1.1 Morfologi Tanaman Asam Jawa

Tanaman asam dapat mencapai tinggi antara 20-30 m dengan lingkaran batang dapat mencapai 2 m. Pohon kuat dan kekar, kulit batang berwarna coklat keabu-abuan dan tidak rata permukaannya seperti dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Rukmana, 2005 ; William, 2006).



Gambar 2.1 Pohon asam jawa (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013)

a. Daun

Daun majemuk tunggal berhadapan, bentuknya lonjong dengan panjang 1-2,5 cm dan lebar 0,5-1 cm, tepi daun rata, berujung tumpul dan pangkal membulat, pertulangan menyirip, halus, berwarna hijau dengan panjang tangkai $\pm 0,2$ cm seperti dapat dilihat pada Gambar 2.2 (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).



Gambar 2.2 Daun asam jawa (Redaksi Intisari, 1999)

b. Batang

Batang tegak bulat, berkayu, warnanya coklat muda, percabangan simpodial, permukaan batang banyak lentisel (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

c. Akar

Akar dari tanaman asam jawa ini termasuk ke dalam golongan akar tunggang (*radix primaria*) dan berwarna coklat (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

d. Bunga

Bunga tanaman asam termasuk bunga majemuk berbentuk tandan, terdapat di ketiak daun, panjang tangkai $\pm 0,6$ cm, kelopak bunga berbentuk tabung berwarna hijau kecoklatan, benang sari berwarna putih, putik berwarna putih, mahkota bunga kecil berwarna kuning (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

e. Buah

Buah asam berbentuk polong dengan panjang ± 10 cm dan lebar ± 2 cm, berwarna coklat seperti pada Gambar 2.3 (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).



Gambar 2.3 Buah asam jawa (Redaksi Intisari, 1999)

f. Biji

Bentuk biji kotak pipih dan berwarna coklat (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

2.1.2 Kandungan Tanaman Asam Jawa

Buah asam jawa mengandung asam apel, asam sitrat, asam anggur, asam tartrat, asam suksinat, pektin dan gula *invert*. Buah asam jawa yang masak memiliki kandungan gizi yang tinggi, dalam 100 gram asam jawa menyediakan energi sebesar 239,00 kal, protein 2,80 g, lemak 0,60 g, karbohidrat 62,50 g, kalsium 74,00 mg, zat

besi 0,60 mg, vitamin A 30,00 SI, vitamin B 0,34 mg dan vitamin C 2,00 mg (Agromedia, 2008). Komposisi kimia daun asam jawa secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.1. Menurut hasil uji fitokimia yang dilakukan Nwodo *et al.* (2011) daun asam jawa mengandung karbohidrat, *reducing sugar*, tanin, flavonoid, *anthroquinone*, saponin, alkaloid, *cyanogenic glycosides*, *terpenes* dan *sterols*.

Tabel 2.1 Komposisi kimia daun asam jawa

Kandungan	Jumlah
Proteins (g)	4,0-5,8
Fat/oil (g)	1,2-2,1
Fibre (g)	1,9-3,0
Carbohydrate (total) (g)	16,0-18,0
Calcium (mg)	101-250
Magnesium (mg)	71,0
Phosphorus (mg)	140,0
Iron (mg)	2,0-5,2
Copper (mg)	2,0
Chlorine (mg)	94,0
Sulphur (mg)	63,0
Thiamine (mg)	0,1-0,2
Riboflavin (mg)	0,1-0,2
Niacin (mg)	1,5-4,1
Vitamin C (mg)	3,0-6,0
Sodium (mg)	8,0
Potassium (mg)	270,0
-carotene (μg)	2500
Calories (Kcal)	75,0
Oxalic acid (mg)	196,0

Sumber: William (2006)

2.1.3 Manfaat Tanaman Asam Jawa

Tanaman asam jawa telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat untuk kehidupan sehari-hari. Buah muda maupun masak dan bunga biasa dimanfaatkan sebagai bumbu masak. Buah mentah varietas manis biasanya dimakan segar sedangkan varietas asam dibuat menjadi jus, selai, sirup dan permen. Tepung dari biji dapat dibuat menjadi kue dan roti. Biji dapat dipanggang dan menjadi bahan makanan (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

Tanaman asam jawa juga memiliki beberapa manfaat untuk pengobatan tradisional. Kulit batangnya memiliki efek astringen dan tonikum, biasanya digunakan untuk mengatasi gangguan pencernaan, selain itu kulit batang juga dapat dibuat sediaan bentuk *lotion* atau tapal untuk meredakan luka, borok, bisul dan ruam. Kulit batang juga dapat dibuat bentuk dekokta untuk pengobatan asma, gangguan menstruasi dan antitemam. Daun yang masih muda dapat dimanfaatkan untuk pengobatan rematik, borok dan luka dengan dipakai secara topikal serta dapat dibuat tapal untuk mengurangi bengkak dan rasa sakit pada radang sendi. Jus hangat daun yang disaring dan tapal bunga untuk mengobati mata merah. Daging buah digunakan sebagai bedak dingin, pencahar dan mengatasi bibir pecah-pecah. Serbuk biji digunakan dalam pengobatan disentri dan diare (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2013).

2.2. *Streptococcus mutans*

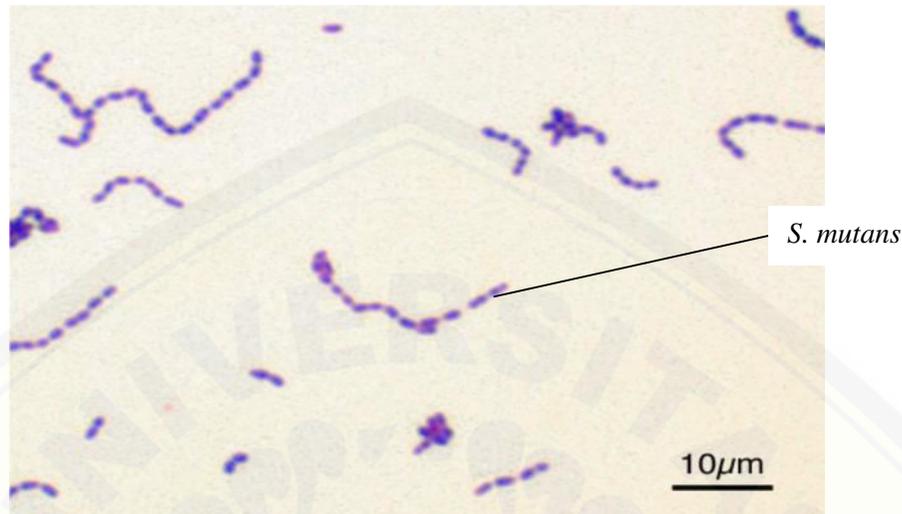
S. mutans secara taksonomi dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

<i>Kingdom</i>	: <i>Monera</i>
<i>Divisio</i>	: <i>Firmicutes</i>
<i>Class</i>	: <i>Bacilli</i>
<i>Order</i>	: <i>Lactobacilalles</i>
<i>Family</i>	: <i>Streptococcaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Streptococcus</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Streptococcus mutans</i> (Nugraha, 2008)

2.2.1 Karakteristik, Patogenitas dan Struktur Antigen *Streptococcus mutans*

S. mutans adalah bakteri Gram positif yang khasnya berbentuk bulat berpasangan atau membentuk rantai selama pertumbuhannya (Gambar 2.4) dengan diameter 0,5-2,0 μm . Bakteri ini tidak bergerak, tidak berspora dan dapat hidup secara fakultatif anaerob. Sebagai bakteri yang anaerob bakteri ini memerlukan 5% CO_2 dan nitrogen 95%. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu 18°-40°C (Nugraha, 2008; Holt *et al.*, 1994; Nolte, 1982). Kebanyakan *Streptococcus* tumbuh dalam media padat sebagai koloni *discoïd*. Media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan *Streptococcus* yaitu *blood agar plate*, *manit salt agar* (MSA), *brain heart infusion broth/BHI-B* dan *trypton yeast cystein* (Sukanto dkk., 2002). Pada MSA koloni *S. mutans* kecil, timbul, tepi tidak beraturan dan melekat. Pada media agar yang mengandung sukrosa, sebagian besar strain *S. mutans* menghasilkan koloni sekitar 1 mm berbentuk butiran, tetesan atau genangan air. Pada *blood agar* yang diinkubasi secara anaerob selama dua hari, koloni *S. mutans* berwarna putih atau abu-abu, berbentuk lingkaran atau tidak teratur 0,5-1,0 mm dan kadang-kadang cenderung melekat pada permukaan agar (Hardie, 1986).

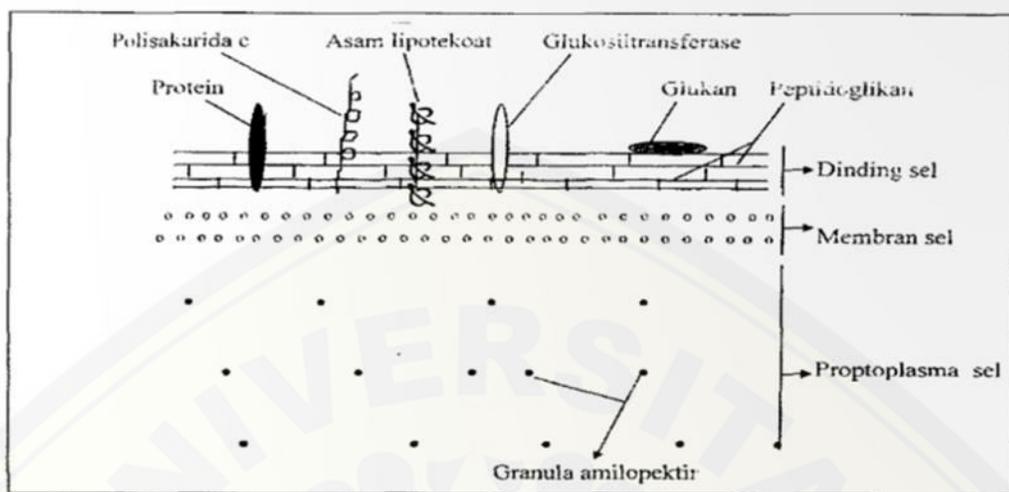
S. mutans merupakan mikroorganisme penyebab utama terjadinya karies gigi karena dapat menghasilkan asam (asidogenik) dan hidup dalam suasana asam (asidurik). Bakteri ini dikemukakan pertama kali oleh Clarke pada tahun 1924 setelah mengisolasi dari suatu lesi karies (Banu, 2010). Salah satu sifat penting dari virulensi organisme ini adalah kemampuan mereka untuk membentuk *biofilm* yang dikenal sebagai plak gigi pada permukaan gigi (Yoshida & Kuramatsu, 2002). Karakteristik dari bakteri ini yaitu mampu mensintesis polisakarida ekstraseluler glukon ikatan (1-3) yang tidak larut dari sukrosa, dapat memproduksi asam laktat melalui proses homofermentasi, membentuk koloni yang melekat dengan erat pada permukaan gigi dan lebih bersifat asidogenik dibanding *Streptococcus* lainnya (Sabir, 2005).



Gambar 2.4 *Streptococcus mutans* (Forssten *et al.*, 2010)

S. mutans terdiri dari dinding sel dan membran protoplasma sama seperti bakteri kokus Gram positif lainnya. Komponen penyusun dinding sel terbesar adalah peptidoglikan setebal 20-80 nm dengan komposisi terbanyak *teichoic*, asam *teichoic* dan berbagai macam polisakarida (Gambar 2.5). Sedangkan struktur antigenik dinding sel *S. mutans* terdiri dari antigen protein, polisakarida spesifik dan asam lipotekoat. Antigen-antigen tersebut menentukan imunogenitas *S. mutans* (Nasution, 2006; Hanif, 2009).

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 *S. mutans* dan pelikel-pelikel di permukaan gigi (Nasution, 2006).



Gambar 2.5 Struktur dinding sel *Streptococcus mutans* (Bidarisugma dkk., 2012)

2.3 Daya Antibakteri

Daya antibakteri adalah kemampuan suatu bahan dalam membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia dengan cara mengganggu metabolisme bakteri patogen. Bahan ini ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, bahan tersebut haruslah bersifat sangat toksis untuk bakteri tetapi relatif tidak toksik untuk hospes (Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI, 2007). Dalam bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja sebagai zat yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri (bakteriostatik), membunuh bakteri (bakterisidal) dan memecahkan dinding sel bakteri (bakterilolitik) (Kusmiyati & Agustini, 2007).

2.3.1 Mekanisme Kerja Antibakteri

Brooks *et al.* (2005) menyatakan bahwa mekanisme kerja antibakteri antara lain melalui inhibisi sintesis dinding sel, inhibisi fungsi membran sel, inhibisi sintesis protein dan inhibisi sintesis asam nukleat.

a. Inhibisi sintesis dinding sel

Bakteri mempunyai lapisan luar yang kaku yaitu dinding sel. Dinding sel berfungsi untuk mempertahankan bentuk dan ukuran mikroorganisme yang mempunyai tekanan osmotik internal tinggi. Tekanan internal tersebut besarnya tiga hingga lima kali lebih besar pada bakteri Gram positif daripada bakteri Gram negatif. Kerusakan pada dinding sel karena inhibisi pada pembentukannya dapat menyebabkan sel menjadi lisis. Dinding sel mengandung polimer kompleks mukopeptida (peptidoglikan) yang khas secara kimiawi, yang terdiri dari polisakarida dan polipeptida dengan banyak hubungan silang. Polisakarida tersebut biasanya mengandung gula asam amino N-asetilglukosamin dan asam asetilmuramat (Brooks *et al.*, 2005). Zat antibakteri menghambat sintesis peptidoglikan dinding sel bakteri dengan menghambat kerja enzim transpeptidase dan enzim rasemase alanine atau dengan menghambat sintesis asam asetilmuramat. Senyawa penisilin dan sefalosporin yang secara struktur mirip, dan senyawa-senyawa yang tidak mirip seperti sikloserin, vankomisin dan basitracin merupakan zat antibakteri yang bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel (Setiabudy & Gan, 1995 ; Chambers, 2007).

b. Inhibisi fungsi membran sel

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh membran sitoplasma yang berperan sebagai barrier permeabilitas selektif, membawa fungsi transport aktif dan kemudian mengontrol komposisi internal sel. Membran sel memelihara integritas komponen-komponen seluler (Brooks *et al.*, 2005). Senyawa yang bekerja langsung pada membran sel mikroorganisme, mempengaruhi permeabilitas dan menyebabkan kebocoran senyawa-senyawa intraseluler. Dalam hal ini termasuk senyawa yang bersifat detergen seperti polimiksin dan amfoterisin B yang berikatan dengan sterol-sterol dinding sel (Chambers, 2007). Kerusakan pada membran ini akan mengganggu permeabilitas sel bakteri yang mengakibatkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Rahmawati & Siti, 2014).

c. Inhibisi sintesis protein

Untuk kehidupannya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Bakteri memiliki unit ribosom 30S dan 50S yang berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Sintesis protein dihambat dengan mempengaruhi fungsi subunit ribosom 30S atau 50S sehingga menyebabkan penghambatan sintesis protein yang *reversible* dan mengakibatkan kematian sel. Obat bakteriostatik yang dapat menghambat sintesis protein pada bakteri meliputi kloramfenikol, golongan tetrasiklin, eritromisin, klindamisin, pristinamin dan aminoglikosida (Setiabudy & Gan, 1995; Chambers, 2007).

d. Inhibisi sintesis asam nukleat

DNA, RNA dan protein memegang peranan amat penting didalam proses kehidupan normal sel. Hal itu berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel (Rahmawati & Siti, 2014). Antibakteri yang tergolong kelompok ini adalah kuinolon, pirimetamin, rifampin, sulfanomid, trimetropim dan trimetresat. Rifampin menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara berikatan kuat pada RNA polimerase dependen DNA bakteri. Semua kuinolon dan fluotokuinolon menghambat sintesis DNA mikroba dengan menghambat DNA girase (Brooks *et al.*, 2005).

2.3.2 Uji Daya Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok dibawah ini yaitu:

a. Metode dilusi

Cara ini digunakan untuk menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari bahan antimikroba. Prinsip metode ini yaitu menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan bahan yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya seri tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama

18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah bahan pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari bahan uji. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari bahan terhadap bakteri uji (Tim Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, 2003).

b. Metode difusi

Metode difusi dapat dilakukan dengan cakram kertas (*paper disc*) maupun sumuran.

1) *Disc diffusion method* (Kirby Bauer)

Metode ini menggunakan cakram kertas yang mengandung bahan tertentu ditanam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang diuji, kemudian diinkubasi pada suhu 36°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih di sekeliling cakram kertas. Zona ini yang dimaksud dengan zona hambat yang menandakan tidak adanya pertumbuhan mikroba. Diameter zona sebanding dengan jumlah bahan uji yang ditambahkan ke cakram kertas. Metode ini secara rutin digunakan untuk menguji sensitivitas antibiotik untuk bakteri patogen (Madigan & Martinko, 2005).

2) *Well diffusion method*

Metode lubang atau sumuran prinsipnya yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan bahan yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya zona jernih di sekeliling lubang sumuran (Tim Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, 2003).

Klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri berdasarkan besar diameter zona hambat (Susanto dkk., 2012).

- 1) Diameter zona hambat ≤ 5 mm maka bahan diklasifikasikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan intensitas lemah.
- 2) Diameter zona hambat 6-10 mm maka bahan diklasifikasikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan intensitas sedang.
- 3) Diameter zona hambat 11-20 mm maka bahan diklasifikasikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan intensitas kuat.
- 4) Diameter zona hambat ≥ 21 mm maka bahan diklasifikasikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan intensitas sangat kuat.

2.4 Metode Ekstraksi Simplisia

Metode ekstraksi bahan alam dengan menggunakan pelarut dibedakan menjadi 2 cara yaitu cara dingin (*cold processing*) dan cara panas (*heat processing*).

1. Cara dingin

Metode ekstraksi ini adalah yang paling sederhana. Prinsip dari metode ini yaitu mengekstraksi bahan kering pada suhu kamar secara berturut-turut dengan pelarut yang kepolarannya makin tinggi. Keuntungan cara ini merupakan metode ekstraksi yang mudah karena ekstrak tidak dipanaskan sehingga kemungkinan kecil bahan alam menjadi terurai. Penggunaan pelarut dengan peningkatan kepolaran bahan alam secara berurutan memungkinkan pemisahan bahan-bahan alam berdasarkan kelarutannya dan polaritasnya dalam pelarut ekstraksi. Hal ini sangat mempermudah proses isolasi. Ekstraksi dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi. Berikut ini yang termasuk dalam ekstraksi dingin (Heinrich *et al.*, 2004)

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan atau kamar. Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Maserasi digunakan untuk ekstraksi

simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan pelarut, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan pelarut, tidak mengandung benzoin dan lainnya (Departemen Kesehatan RI, 1986). Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

b. Perkolasi

Perkolasi berasal dari kata “perkolare” yang artinya penetasan (Voigt, 1995). Perkolasi adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Prinsip perkolasi adalah dengan menempatkan serbuk simplisia pada suatu bejana silinder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Proses terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

2. Cara panas

Ekstraksi cara panas merupakan ekstraksi menggunakan pelarut yang suhunya ditingkatkan. Berikut ini adalah yang termasuk ke dalam metode ekstraksi cara panas.

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendinginan balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga termasuk proses ekstraksi sempurna (Departemen Kesehatan RI, 2000).

b. Sokletasi

Sokletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Biomasa ditempatkan dalam wadah soklet yang dibuat dengan kertas saring, melalui alat ini pelarut akan terus direfluks. Alat soklet akan mengkosongkan isinya kedalam labu dasar bulat

setelah pelarut mencapai kadar tertentu. Setelah pelarut segar melewati alat ini melalui pendingin refluks, ekstraksi berlangsung sangat efisien dan senyawa dari biomassa secara efektif ditarik ke dalam pelarut karena konsentrasi awalnya rendah dalam pelarut (Departemen Kesehatan RI, 2000).

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik yaitu dengan pengadukan kontinu pada temperatur ruangan atau kamar, secara umum dilakukan pada temperatur 40°C-50°C (Departemen Kesehatan RI, 2000).

d. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air dipanaskan dengan menggunakan panci penangas air selama 15 menit, dengan temperatur air mencapai 100°C dan temperatur uap mencapai 90°C. Proses infus digunakan untuk memperoleh zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati (Departemen Kesehatan RI, 2000).

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air, yakni 30 menit pada suhu 90°C-100°C. Cara ini dapat dilakukan untuk simplisia yang mengandung bahan aktif yang tahan terhadap pemanasan (Departemen Kesehatan RI, 2000).

2.5 Daya Antibakteri Infusa Daun Asam Jawa

Kandungan daun asam jawa yang mempunyai aktivitas antibakteri antara lain flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, Vitamin C dan *chlorine*.

1. Flavonoid

Banyak penelitian yang telah membuktikan adanya berbagai aktivitas farmakologis dan biologis dari senyawa flavonoid yang salah satunya yaitu aktivitas antibakteri (Sabir, 2005). Menurut berbagai literatur, flavonoid sebagai derivat dari fenol dapat mendenaturasi protein dan merusak dinding sel dengan cara melarutkan lipid yang terdapat pada dinding sel (Ajizah, 2004).

Flavonoid juga dikenal dengan kemampuan antioksidannya. Kemampuan flavonoid untuk menjalankan fungsi antioksidan bergantung pada struktur molekulnya, posisi gugus hidroksil memiliki peranan dalam fungsi antioksidan dan aktivitas menyingkirkan radikal bebas (Markham, 1988). Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Redha, 2010).

2. Tanin

Tanin mempunyai sifat atau daya bakteriostatik dan fungistik. Tanin juga diduga mempunyai efek antibakteri yang sama dengan senyawa fenolik yaitu dengan cara mempresipitasi protein. Senyawa ini dapat mengganggu permeabilitas membran sel bakteri sehingga sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup yang berakibat terhambatnya pertumbuhan atau bahkan kematian. Efek antibakteri lain dari tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik (Ajizah, 2004).

3. Alkaloid

Alkaloid dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri dengan cara berikatan dengan protein pengikat non enzim yang mempunyai sifat mengikat suatu zat tertentu, protein ini dikenal dengan nama protein porin. Pada beberapa bakteri ikatan protein terdapat pada ruang periplasmik. Protein ini memiliki fungsi memindah substrat yang terikat dengannya kedalam membran transport protein yang sesuai. Protein porin inilah yang kemudian akan mengikat alkaloid, kemudian dibawa masuk oleh molekul pembawanya yang terikat pada membran sitoplasma bakteri. Karena berfungsi sebagai antibakteri, alkaloid akan merusak protein dan fosfolipid sel-sel membran bakteri. Selain itu senyawa alkaloid dapat menginaktifkan enzim-enzim dan merusak asam amino dalam sel protein di membran sel. Padahal membran sitoplasma atau membran sel terdiri dari lipid dan enzim-enzim yang berfungsi sebagai aktivitas transport zat-zat yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup bakteri. Sel yang berada dalam kondisi tidak normal ini kemudian akan mengalami kerusakan pada membran

selnya karena daya aktivitas alkaloid, maka selanjutnya akan berakibat pada terhambatnya pertumbuhan sel atau kematian sel (Jawetz *et al.*, 1996).

4. Saponin

Saponin merupakan salah satu senyawa glikosida dan sterol yang berfungsi sebagai senyawa aktif permukaan, selain itu kemampuannya bisa dideteksi dalam membentuk busa dan menghemolisis darah karena memiliki sifat seperti sabun (Pratiwi, 2007). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin dapat menjadi antibakteri karena zat aktif permukaannya mirip detergen, akibatnya saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri. Saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Jawetz *et al.*, 1996).

5. Vitamin C

Daun asam jawa mengandung vitamin C atau L-asam askorbat yang merupakan antioksidan yang larut dalam air (*aqueous antioxidant*). Senyawa ini merupakan salah satu senyawa imunostimulator karena merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh terhadap senyawa oksigen reaktif dalam plasma dan sel dan juga mampu meningkatkan kinerja sistem imun dalam tubuh. Sebagai antioksidan, vitamin C bekerja sebagai donor elektron, dengan cara memindahkan satu elektron ke senyawa logam Cu. Selain itu, vitamin C juga dapat menyumbangkan elektron ke dalam reaksi biokimia intraseluler dan ekstraseluler (Joniada, 2011).

6. Chlorine

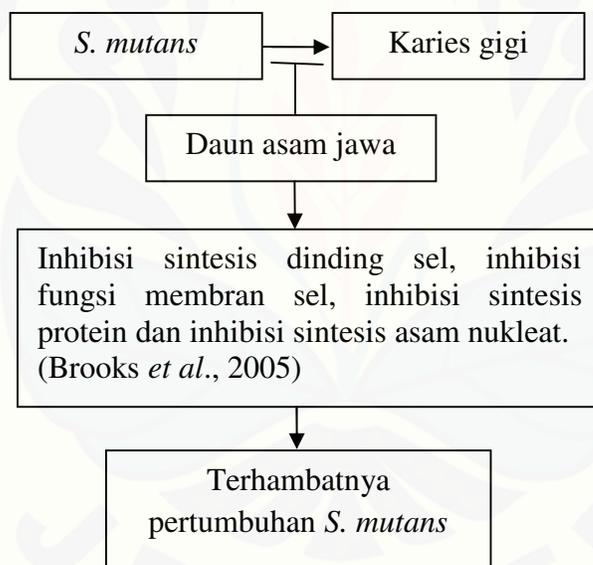
Mekanisme cara senyawa *chlorine* dapat mematikan bakteri belum sepenuhnya diketahui, namun diduga asam hipoklorit (HOCl) yang merupakan senyawa *chlorine* paling aktif akan menghambat oksidasi glukosa dalam sel mikroorganisme dengan cara menghambat enzim-enzim yang terlibat dalam

metabolisme karbohidrat. Konsentrasi yang diperlukan agar *chlorine* efektif untuk membunuh mikroorganisme adalah 50-100 ppm (ppm = *part per million*, bagian per sejuta) dengan waktu kontak sekitar 1 menit, pada suhu minimum 24°C (Purnawijayanti, 2001)

2.6 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dapat ditarik hipotesis pada penelitian ini yaitu infusa daun asam jawa memiliki daya antibakteri terhadap *S. mutans*.

2.7 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :

- | : menghambat
 —> : menghasilkan/menyebabkan

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (Notoadmojo, 2005).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan pada penelitian ini menggunakan *the post test only control group design* (Notoadmojo, 2005).

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Dental Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan pembuatan infusa daun asam jawa dilakukan di Laboratorium *Bioscience*, Rumah Sakit Gigi dan Mulut Universitas Jember pada bulan Maret - Juni 2015.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah infusa daun asam jawa dengan konsentrasi 100%, 50% dan 25%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah terhambatnya pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

3. Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah media pembiakan *S. mutans* (BHI-A), suspensi bakteri *S. mutans* (standart Mc Farland 0,5 = 3×10^6 CFU/ml), suhu inkubasi (37°C) dan lama inkubasi (24 jam).

3.5 Definisi Operasional Penelitian

1. Infusa daun asam jawa adalah daun asam jawa yang diekstraksi menggunakan metode infusa dengan cara mencampurkan 50 gram daun asam jawa dengan 50 ml aquades steril kemudian dipanaskan pada *waterbath* selama 15 menit terhitung mulai suhu mencapai 90°C.
2. *S. mutans* adalah bakteri anaerob fakultatif, non hemolitik asidogenik yang memproduksi polisakarida ekstraseluler dan interseluler (Lehner, 1995). Koloni *S. mutans* berbentuk bulat dan berwarna putih yang khas membentuk pasangan atau rantai dalam masa pertumbuhannya.
3. Terhambatnya pertumbuhan *S. mutans* adalah hilangnya kemampuan *S. mutans* untuk dapat membelah diri karena pengaruh senyawa antibakteri dari suatu bahan. Pada penelitian ini uji daya antibakteri menggunakan metode difusi cakram dengan cara mengamati zona hambat yaitu daerah jernih di sekeliling cakram kertas yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada daerah tersebut.

3.6 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah cakram kertas yang diletakkan pada media yang telah diinokulasikan bakteri *S. mutans*.

3.6.1 Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus menurut Federer (1977) sebagai berikut:

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

Keterangan :

n : jumlah pengulangan

t : jumlah perlakuan

Penghitungan jumlah sampel penelitian adalah sebagai berikut:

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

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

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq \frac{19}{4}$$

$$n \geq 4,75 \approx 5$$

Berdasarkan hasil penghitungan tersebut diperoleh jumlah sampel minimal adalah 5 untuk setiap kelompok.

3.6.2 Pengelompokan Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan yaitu:

- a. Kelompok kontrol positif (*chlorhexidine* 0,2%) /K+
- b. Kelompok kontrol negatif (aquades steril) /K-
- c. Kelompok infusa daun asam jawa 100% (A100)
- d. Kelompok infusa daun asam jawa 50% (A50)
- e. Kelompok infusa daun asam jawa 25% (A25)

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: tabung *erlenmeyer* (Schott Duran, *Germany*), *petridish* tidak bersekat, tabung reaksi (Pyrex, *Japan*), *beaker glass* (Pyrex, *Japan*), pelubang kertas, gigaskrin, ose, bunsen (Pyrex, *Japan*), *syringe*, mikropipet (Eppendorf, *Italy*), corong *bunchner*, spatula kaca, jangka sorong digital (Medesy, *Italy*), neraca (Cent-O-Cram, Ohaus, USA), spektrofotometer (Milton Roy, Spectronic 20+, *Germany*), *laminar flow cabinet* (Dwyer, USA), *thermolyne* (Maxi Mix II, Dubuque, Iowa, USA), desikator (Kartell, *Italy*), *autoclave* (Mommert, *Germany*), inkubator (Binder, tipe 17053099003100, *Germany*), kompor

listrik (Maspion, Indonesia), *water bath* (Labtech, Korea), kertas saring (Whatman No. 42, UK), aluminium foil (Utensil, China), spidol (Snowman, Japan), *blender* (Phillips, Netherland).

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: bakteri *Streptococcus mutans* (Balai Besar Laboratorium Kesehatan/BBLK Surabaya, Jawa Timur-Indonesia), daun asam jawa (perkebunan di daerah Subang, Jawa Barat-Indonesia), *Brain Heart Infusion Agar/BHI-A* (Merck, Germany), *Brain Heart Infusion Broth/BHI-B* (Merck, Germany), aquades steril (Kimia Farma, Indonesia), alkohol 70% (Kimia Farma, Indonesia) dan *chlorhexidine* 0,2%.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Tahap Persiapan

a. Uji identifikasi *Streptococcus mutans* dan daun asam jawa

Identifikasi *S. mutans* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember (Lampiran A.1). Identifikasi daun asam jawa dilakukan di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan-Jawa Timur (Lampiran A.2).

b. Pembuatan infusa daun asam jawa

Daun asam jawa dibersihkan dengan air mengalir lalu dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari tidak langsung dengan ditutupi kain hitam di atasnya (Nuria dkk., 2009). Setelah kering daun asam jawa dibuat serbuk menggunakan *blender*. Pembuatan infusa daun asam jawa dimulai dengan menimbang 50 gram serbuk daun asam jawa dan ditambahkan 50 ml aquades steril yang dimasukkan ke dalam botol laboratorium, kemudian dipanaskan menggunakan *water bath* selama 15 menit terhitung saat suhu mencapai 90°C. Selanjutnya larutan infusa dalam keadaan panas tersebut disaring menggunakan corong kaca yang dilapisi

kertas saring (Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, 2010). Hasil dari proses tersebut merupakan infusa daun asam jawa dengan konsentrasi 100%.

c. Pembuatan konsentrasi infusa daun asam jawa

Konsentrasi infusa daun asam jawa yang digunakan adalah 25%, 50% dan 100%. Konsentrasi daun asam jawa 25% dan 50% didapatkan dengan cara melakukan pengenceran di dalam *laminar flow cabinet* dengan menambahkan aquades steril menggunakan rumus pengenceran sebagai berikut:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan:

M1 : Kemolaran sebelum pengenceran

M2 : Kemolaran sesudah pengenceran

V1 : Volume sebelum pengenceran

V2 : Volume sesudah pengenceran

Dimana :

M1V1 : Volume dan konsentrasi larutan asal

M2V2 : Volume dan konsentrasi larutan hasil pengenceran

V2-V1 : Volume pelarut yang ditambahkan

Cara pengencerannya yaitu :

- 1) Untuk memperoleh infusa daun asam jawa dengan konsentrasi 50% sebanyak 5 ml :

$$100\% \times V1 = 50\% \times 5 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{50\% \times 5 \text{ ml}}{100\%}$$

$$100\%$$

$$V1 = 2,5 \text{ ml}$$

Volume pelarut yang ditambahkan adalah :

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

$$= 2,5 \text{ ml aquades steril}$$

Jadi untuk mendapatkan larutan infusa daun asam jawa konsentrasi 50% diperoleh dengan cara menambahkan aquades steril sebanyak 2,5 ml ke dalam 2,5 ml larutan infusa daun asam jawa konsentrasi 100%.

- 2) Untuk memperoleh infusa daun asam jawa dengan konsentrasi 25% sebanyak 5 ml :

$$100\% \times V1 = 25\% \times 5 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{25\% \times 5 \text{ ml}}{100\%}$$

$$V1 = 1,25 \text{ ml}$$

Volume pelarut yang ditambahkan adalah :

$$V2 - V1 = 5 \text{ ml} - 1,25 \text{ ml}$$

$$= 3,75 \text{ ml aquades steril}$$

Jadi untuk mendapatkan larutan infusa daun asam jawa konsentrasi 25% diperoleh dengan cara menambahkan aquades steril sebanyak 3,75 ml ke dalam 1,25 ml larutan infusa daun asam jawa konsentrasi 100%.

- d. Mempersiapkan media *Brain Heart Infusion Agar* (BHI-A) dan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B)

Mempersiapkan media BHI-A dengan cara menimbang 5,7 gram bubuk BHI-A menggunakan neraca dan mengukur aquades steril sebanyak 100 ml menggunakan gelas ukur. Kedua bahan dicampurkan ke dalam tabung *erlenmeyer*, diaduk dengan pengaduk kaca, kemudian dipanaskan di atas kompor sampai mendidih dan homogen. Setelah itu tabung *erlenmeyer* ditutup dengan kapas dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya tabung dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam untuk uji sterilisasi media. Apabila tidak terjadi perubahan warna hal itu menunjukkan bahwa media telah steril.

Mempersiapkan media BHI-B dengan cara menimbang 3,7 gram BHI-B menggunakan neraca dan mengukur aquades steril sebanyak 100 ml menggunakan gelas ukur. Kedua bahan dimasukkan kedalam *erlenmeyer*, diaduk dengan pengaduk

kaca, kemudian dipanaskan di atas kompor sampai mendidih dan homogen. Setelah itu tabung *erlenmeyer* ditutup dengan kapas dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya tabung dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam untuk uji sterilisasi media. Apabila tidak terjadi perubahan warna hal itu menunjukkan bahwa media telah steril.

e. Mempersiapkan suspensi *Streptococcus mutans*

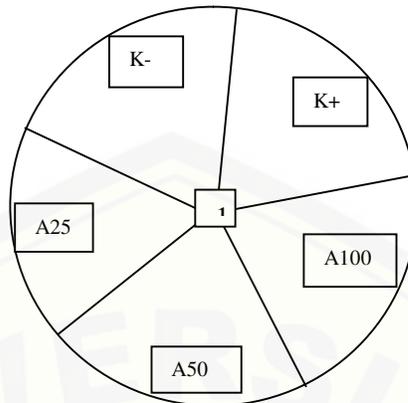
Pembuatan suspensi *S. mutans* dengan cara mencampurkan 2 ml larutan BHI-B steril dan 1 ose *S. mutans* di dalam tabung reaksi. Setelah itu tabung reaksi dimasukkan ke dalam desikator dan diinkubasi menggunakan inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam suspensi *S. mutans* diambil dari inkubator dan dikocok hingga homogen menggunakan *thermolyne*. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansinya dengan alat spektrofotometer menggunakan larutan standar Mc Farland 0,5 dan panjang gelombang diatur menjadi 560 nm.

f. Pembuatan cakram kertas

Membuat cakram kertas dari kertas saring Whatman No. 42 dengan cara dipotong diameter 0,5 cm menggunakan alat pelubang kertas atau *two hole punch*. Selanjutnya cakram kertas dilakukan sterilisasi dengan sinar UV dari *laminar flow cabinet* selama 15 menit.

3.8.2 Uji Daya Antibakteri

Sebelum dilakukan uji daya antibakteri terlebih dahulu disiapkan 5 buah *petridish*. Pada bagian bawah setiap *petridish* dibagi menjadi 5 daerah dengan menggunakan spidol. Sedangkan pada setiap tutupnya diberi 6 kertas label. Satu kertas label diletakkan pada bagian tengah tutup dan diberi keterangan nomor urut *petridish*, 5 kertas label lainnya diletakkan sesuai pembagian daerah di bagian bawah *petridish* dan diberi keterangan nama kelompok (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Pembagian daerah dan pemberian kertas label pada *petridish*. Angka 1: nomor urut *petridish*, A100: konsentrasi infusa daun asam jawa 100%, A50: konsentrasi infusa daun asam jawa 50%, A25: konsentrasi infusa daun asam jawa 25%, K+: kontrol positif dan K-: kontrol negatif.

Pada setiap *petridish* tersebut dituangkan media BHI-A hangat sebanyak 25 ml dengan ketebalan 4 mm, tunggu media sampai dingin dan padat sehingga didapatkan media lempeng. Suspensi *S. mutans* diambil sebanyak 0,5 ml menggunakan *syringe* kemudian diinokulasikan pada media lempeng BHI-A. Selanjutnya dilakukan uji daya antibakteri menggunakan metode difusi cakram (*disc diffusion method*) atau lebih dikenal sebagai metode Kirby Bauer dengan prosedur sebagai berikut.

- Menyiapkan 5 cakram kertas untuk setiap kelompok.
- Secara aseptis masing-masing bahan (sesuai kelompok) diteteskan sebanyak $13\mu\text{l}$ pada cakram kertas dengan menggunakan *syringe*.
- Cakram kertas diambil dengan pinset dan diletakkan diatas permukaan media lempeng BHI-A sesuai dengan label pada *petridish*.
- Seluruh *petridish* dimasukkan ke dalam desikator untuk mendapatkan suasana fakultatif anaerob dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Setelah diinkubasi selama 24 jam *petridish* dikeluarkan dari inkubator.
- Selanjutnya dilakukan pengamatan dan pengukuran dengan cara sebagai berikut. Pertama-tama *petridish* dibalik agar zona hambat terlihat jelas. Zona hambat

ditunjukkan dengan terlihatnya daerah jernih di sekeliling cakram kertas. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona hambat dengan menggunakan jangka sorong digital dengan ketelitian 0,01 mm. Cara mengukur daerah zona hambat adalah mengukur diameter keseluruhan baik daerah jernih maupun diameter cakram kertas. Apabila terdapat diameter zona hambat yang pendek (a mm) dan panjang (b mm) maka keduanya dijumlah kemudian dibagi dua.

$$\frac{a+b}{2}$$

- g. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali oleh 3 orang pengamat yang berbeda yang telah dilakukan persamaan persepsi dan hasil pengukuran diambil rata-rata.

3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji Shapiro Wilk dan uji Levene untuk menguji homogenitasnya. Apabila kedua uji menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji statistik parametrik dengan *one way* ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji Turkey LSD (*Least Significance Different*) untuk mengetahui besar perbedaan antar kelompok ($p < 0,05$). Jika hasil data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilakukan uji statistik non parametrik. Pada uji statistik non parametrik dilakukan uji Kruskal-Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan masing-masing kelompok dan dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui besarnya perbedaan antar kelompok.

3.10 Alur Penelitian

