



AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis L*) TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus mutans*

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh
Fathimatuz Zahro FR
NIM. 111610101003

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2015



AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis L*) TERHADAP PERTUMBUHAN *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

Fathimatuz Zahro FR
NIM. 111610101003

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, atas segala limpahan karunia dan rahmat-Nya yang teramat besar.
2. Nabi Muhammad SAW, atas segala tuntunan dan kasihnya kepada seluruh umatnya.
3. Ayahanda Mohammad Farid Wajdi, S. Pd, MM dan Ibu Lailatul Hikmah atas perjuangan, kasih sayang, motivasi, serta doa yang tiada batas.
4. Adik-adikku Faridatul Hikmah, Nabila Iqly Faradila, dan Ahmad Haikal Jaisy Wajdi yang selalu menjadi penyemangat.
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi, terima kasih telah membimbing dan memberi ilmu.
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang selalu saya banggakan.

MOTTO

“Barangsiapa bersungguh-sungguh, sesungguhnya kesungguhannya itu adalah untuk dirinya sendiri.”

(QS Al-Ankabut [29]: 6)

Banyak kegagalan dalam hidup ini dikarenakan orang-orang tidak menyadari betapa dekatnya mereka dengan keberhasilan saat mereka menyerah.

(Thomas Alva Edison)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Fathimatuz Zahro FR

NIM : 111610101003

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis yang berjudul “Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis L*) terhadap Pertumbuhan *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 tidak benar.

Jember, 6 November 2015

Yang menyatakan,

Fathimatuz Zahro FR

NIM 111610101003

SKRIPSI

AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN TEH HIJAU

(*Camellia sinensis L*) TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus mutans*

Oleh

Fathimatuz Zahro FR

NIM. 111610101003

Dosen Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : drg. Izzata Barid, M. Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Dewi Kristiana, M. Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis L*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Jumat, 6 November 2015

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes

NIP 197608092005012002

drg. Nadie Fatimatuzzahro, M. DSc

NIP 198204242008012022

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Izzata Barid, M. Kes

NIP 196805171997022001

drg. Dewi Kristiana, M.Kes

NIP 197012241998022001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prof

NIP.196901121996011001

RINGKASAN

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis L*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*; Fathimatuz Zahro FR, 111610101003; 2015: 57 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Banyak tumbuhan asli yang berasal dari Indonesia berkhasiat sebagai obat dan khasiatnya ini dapat dipertanggungjawabkan. Salah satu contohnya adalah daun teh hijau dari tanaman *Camelia sinensis L*. Tanaman yang mengandung polifenol memiliki sifat sebagai antibakteri, antara lain terhadap *Streptococcus mutans* yang sifatnya kariogenik yang dapat menyebabkan terjadinya karies gigi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan hambat minimum ekstrak daun teh hijau yang mampu menghambat bakteri *Streptococcus mutans* dan untuk mengetahui kemampuan bunuh minimum ekstrak daun teh hijau yang mampu membunuh bakteri *Streptococcus mutans*.

Penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *posttest only control group design* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jumlah sampel yang digunakan 8 sampel pada 3 kelompok perlakuan dengan inkubasi 24 jam dan 3 kelompok perlakuan dengan inkubasi 48 jam pada perlakuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan pada perlakuan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) jumlah sampel yang digunakan 8 sampel pada 3 kelompok perlakuan dengan inkubasi 24 jam dan 3 kelompok perlakuan dengan inkubasi 48 jam.

Data MIC dan MBC yang diperoleh kemudian dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*, dan berdasarkan hasil analisis data yang dilakukan diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada masing-masing konsentrasi uji MBC pada inkubasi 24 jam dan 48 jam.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan, bahwa ekstrak daun teh hijau memiliki kemampuan hambat pada konsentrasi minimal 12,5% terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, dan ekstrak polifenol daun teh hijau memiliki kemampuan bunuh bakteri pada konsentrasi minimal 12,5% terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis L*) terhadap Pertumbuhan *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 terima kasih kepada:

1. drg. Izzata Barid, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
2. drg. Dewi Kristiana, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
3. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Nadie Fatimatuzzahro, M.DSc., yang telah memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
4. Prof. drg Dwi Prijatmoko, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik, yang selalu memberikan bimbingan dan motivasi dalam perjalanan studi selama penulis menjadi mahasiswa;
5. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Prost, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
6. Ayahanda Moh. Farid Wajdi, S.Pd, MM., dan ibu Lailatul Hikmah, terima kasih atas doa yang terus engkau panjatkan, motivasi, kasih sayang dan kesabaran yang amat besar untukku;
7. Adik-adikku Faridatul Hikmah, Nabila Iqly Faradila, dan Ahmad Haikal Jaisy Wajdi, yang telah menjadi penyemangatku.

8. Mifdholin Alim, ST., terima kasih atas kesabaran, semangat, doa, dan motivasinya;
9. Ariska Cyntia Habsari, Ita Kurniawati, Nuril Puspita Rahayu, Retno Arun Winastuti, Oktavia Kusuma Dewi, Ainil Islach, Mila Aditya Zeni, Hanan, Nina Dayu Lutfiyanti, Alifah Sarah Desitarina, Aulia Nurmadiyanti, Puspita Kusumasari, dan Rhanifda Amvitasari, terima kasih sudah menghibur disaat suntuk dan menemani mengerjakan skripsi ini;
10. Seluruh staf dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Jember;
11. Seluruh teman-teman FKG 2011, terima kasih atas motivasi dan kerjasamanya selama ini.
12. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan ketidaksempurnaan dalam penulisan skripsi ini. Untuk itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan skripsi ini.

Jember, 6 November 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Teh.....	4
2.1.1 Pengertian Teh.....	4
2.1.2 Klasifikasi Teh	4
2.1.3 Taksonomi Teh.....	5
2.1.4 Morfologi Teh	5
2.1.5 Kandungan Teh	6
2.2 Mekanisme Daya Antibakteri	8
2.3 <i>Streptococcus mutans</i>	9
2.3.1 Taksonomi <i>Streptococcus mutans</i>	9
2.3.2 Morfologi <i>Streptococcus mutans</i>	10
2.3.3 Habitat <i>Streptococcus mutans</i>	11
2.3.4 Patogenitas <i>Streptococcus mutans</i>	11
2.4 Kerangka Berpikir	12
2.5 Hipotesis.....	12
BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN.....	13
3.1 Jenis Penelitian.....	13
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2.1 Waktu Penelitian	13

3.2.2 Tempat Penelitian.....	13
3.3 Variabel Penelitian	13
3.3.1 Variabel Bebas	13
3.3.2 Variabel Terikat.....	13
3.3.3 Variabel Terkendali.....	13
3.4 Definisi Operasional.....	14
3.4.1 Ekstrak Daun Teh Hijau	14
3.4.2 <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> Ekstrak Teh Hijau terhadap <i>Streptococcus mutans</i>	14
3.4.3 <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> Ekstrak Teh Hijau terhadap <i>Streptococcus mutans</i>	14
3.5 Alat dan Bahan.....	14
3.5.1 Alat	14
3.5.2 Bahan.....	15
3.6 Sampel Penelitian.....	15
3.7 Cara Kerja Penelitian	17
3.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau	17
3.7.2 Pembuatan Media Kultur	17
3.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri	17
3.7.4 Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>	18
3.7.5 Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i>	19

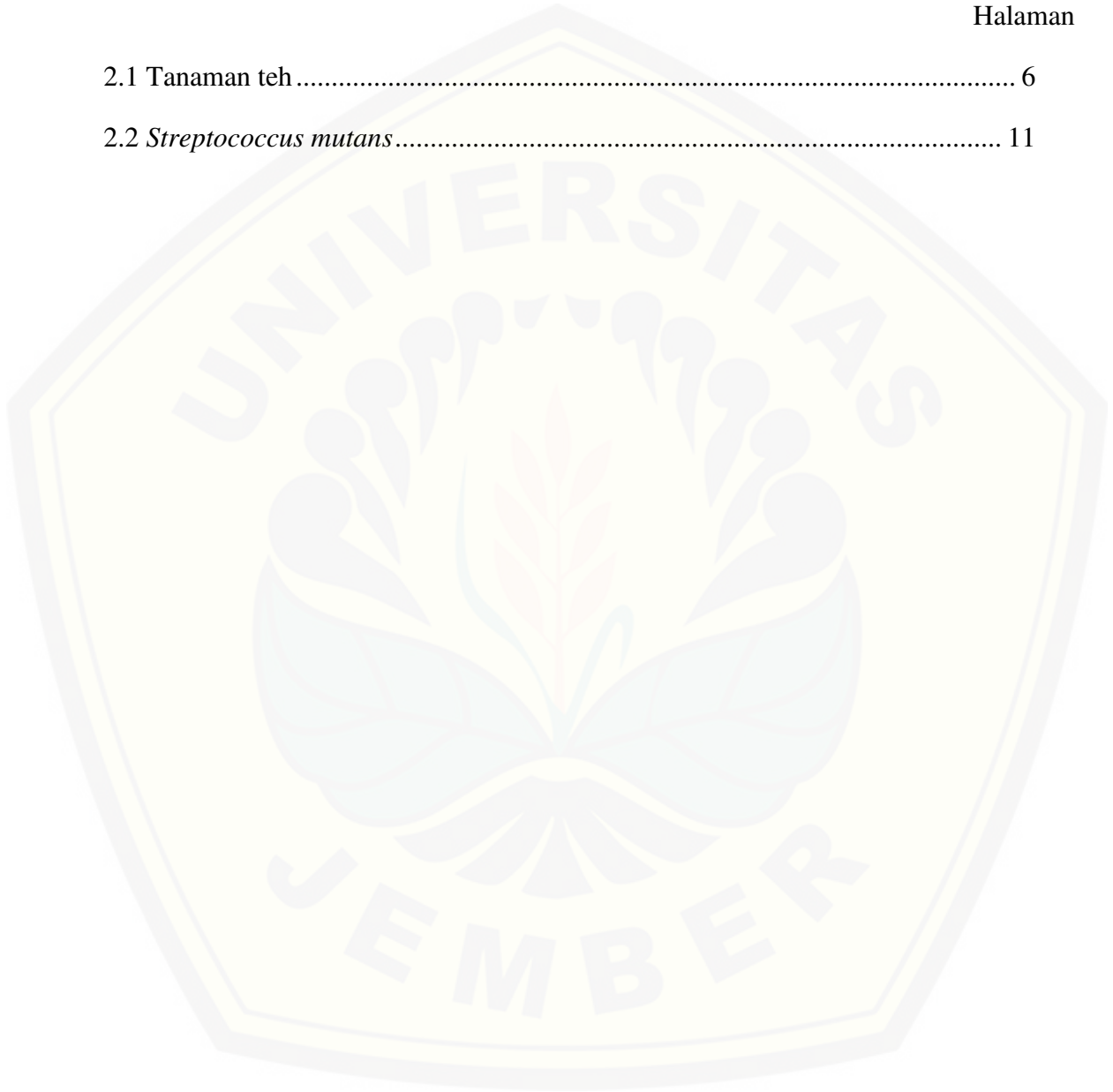
3.8 Analisis Data	19
3.9 Alur Penelitian	20
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4.1 Hasil Penelitian	21
4.2 Pembahasan.....	28
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran.....	31
DAFTAR PUSTAKA	32

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil uji MIC ekstrak daun teh hijau setelah di inkubasi 24 jam	24
4.2 Hasil uji MIC ekstrak daun teh hijau setelah di inkubasi 48 jam	24
4.3 Hasil uji MBC ekstrak daun teh hijau setelah inkubasi 24 jam terhadap <i>S. mutans</i> ..	25
4.4 Hasil uji MBC ekstrak daun teh hijau setelah inkubasi 48 jam terhadap <i>S. mutans</i> ..	26
4.5 Hasil uji <i>Kruskall-Wallis</i> untuk MIC ekstrak daun teh hijau	27
4.6 Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> untuk MIC ekstrak daun teh hijau setelah inkubasi 24 jam	28
4.7 Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> untuk MIC ekstrak daun teh hijau setelah inkubasi 48 jam	28
4.8 Hasil uji <i>Kruskall-Wallis</i> pada uji MIC ekstrak daun teh hijau pada inkubasi 24 jam dan 48 jam	29
4.9 Hasil uji <i>Kruskall-Wallis</i> pada uji MBC ekstrak daun teh hijau	30
4.10 Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> untuk MBC ekstrak daun teh hijau setelah inkubasi 24 jam	30
4.11 Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> untuk MBC ekstrak daun teh hijau setelah inkubasi 48 jam	31
4.12 Hasil uji <i>Kruskall-Wallis</i> pada uji MIC ekstrak daun teh hijau pada inkubasi 24 jam dan 48 jam	31

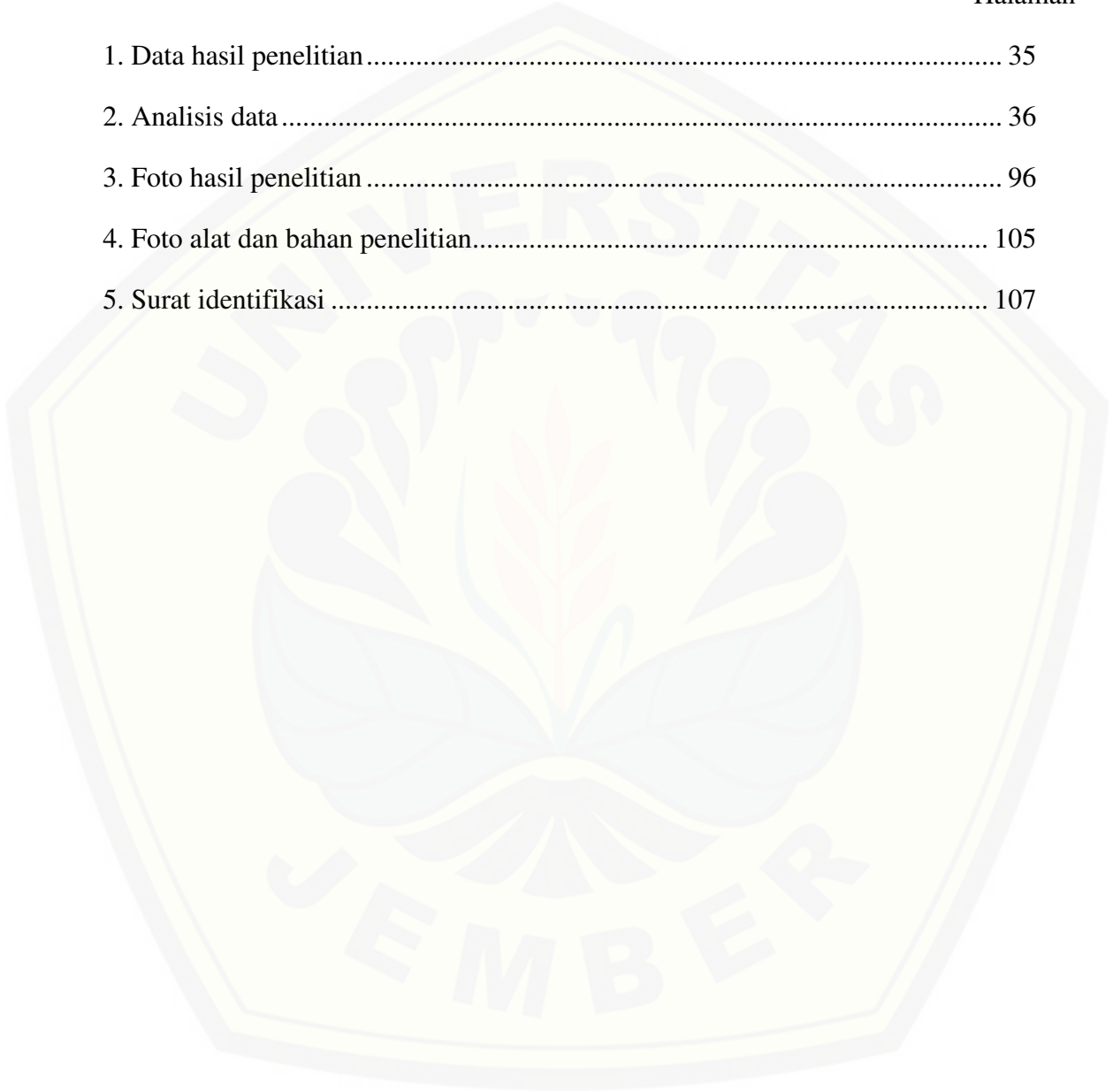
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman teh.....	6
2.2 <i>Streptococcus mutans</i>	11



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Data hasil penelitian	35
2. Analisis data	36
3. Foto hasil penelitian	96
4. Foto alat dan bahan penelitian.....	105
5. Surat identifikasi	107



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Banyak tumbuhan asli yang berasal dari Indonesia berkhasiat sebagai obat dan khasiatnya ini dapat dipertanggungjawabkan. Salah satu contohnya adalah daun teh hijau dari tanaman *Camelia sinensis* L (Widyaningrum, 2013). Menurut Soetedjo, 1988, pada awalnya penyebaran teh hanya terbatas di daerah Tiongkok Barat dan pada akhirnya meluas hingga 30 negara termasuk di Indonesia, serta berkembang menjadi 600 varietas spesifik sesuai lokasi daerah penyebarannya.

Bahan-bahan kimia yang terdapat dalam daun teh dapat digolongkan menjadi empat substansi, yaitu substansi fenol, bukan fenol, penyebab aroma dan enzim. Substansi fenol meliputi polifenol dan flavanol, yang termasuk dalam flavanol diantaranya senyawa kaemferol, kuarsetin, dan mirisetin (Alamsyah, 2006). Substansi bukan fenol meliputi karbohidrat, pektin, alkaloid, protein dan asam-asam amino, klorofil dan zat warna lain, asam organik, resin, vitamin-vitamin, dan mineral. Enzim-enzim meliputi invertase, amilase, β -glukosidase, oksimetilase, protease, dan peroksidase (Towaha *et al.*, 2013). Menurut penelitian yang dilakukan oleh Sundari *et al.*, (2009), daun teh hijau mengandung tiga komponen penting yang mempengaruhi mutu dari teh hijau itu sendiri yaitu kafein, tanin dan polifenol.

Berdasarkan cara pengolahannya, teh dapat dibedakan menjadi tiga kategori yaitu teh hijau, teh hitam, dan teh oolong. Teh hijau merupakan teh yang proses pembuatannya tidak mengalami fermentasi, didapat melalui proses pemanasan dan penguapan (Widyaningrum, 2013). Teh oolong mengalami semi fermentasi, dan teh hitam mengalami fermentasi sepenuhnya (Himawan, 2008). Teh hijau sangat bermanfaat dalam pengobatan tradisional, antara lain teh hijau sebagai obat untuk menurunkan berat badan, menurunkan kolesterol, dan kadar gula darah (Dewi, 2008).

Teh hijau memiliki kandungan polifenol yang lebih besar daripada teh hitam dan teh oolong (Faramayuda *et al.*, 2010). Teh hijau memiliki kandungan polifenol

30-40% (Bruno *et al.*, 2008), sedangkan teh hitam hanya memiliki kandungan polifenol sebanyak 3-10% (Putri, 2012). Kandungan utama yang terdapat dalam teh hijau adalah polifenol yaitu *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) merupakan kandungan terbesar yang ada di dalam teh hijau, *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC) (Alamsyah, 2006).

Tanaman yang mengandung polifenol memiliki sifat sebagai antibakteri, antara lain terhadap *Streptococcus mutans* yang sifatnya kariogenik yang dapat menyebabkan terjadinya karies gigi (Ferrazzano *et al.*, 2011; Sakanaka *et al.*, 1989). Polifenol dapat mengurangi fluiditas membran sel bakteri, yang mengakibatkan terganggunya fungsi membran bakteri (Hirao *et al.* 2010).

Berdasarkan uraian di atas, peneliti ingin meneliti aktivitas antibakteri yang terdapat di dalam ekstrak daun teh hijau. Peneliti ingin menguji efek bakteriostatik dan bakterisid dari ekstrak daun teh hijau terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang menjadi penyebab utama terjadinya karies pada gigi, sehingga perlu dilakukan penelitian terhadap “Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia L. sinensis*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*”.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56% dapat menghambat aktivitas bakteri *Streptococcus mutans*?
2. Apakah ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56% dapat membunuh bakteri *Streptococcus mutans*?
3. Berapakah *Minimum Inhibitory Concentration* ekstrak daun teh hijau yang mampu menghambat bakteri *Streptococcus mutans*?
4. Berapakah *Minimum Bactericidal Concentration* ekstrak daun teh hijau yang mampu menghambat bakteri *Streptococcus mutans*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui daya hambat ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56% terhadap aktivitas bakteri *Streptococcus mutans*.
2. Mengetahui daya bunuh ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56% terhadap aktivitas bakteri *Streptococcus mutans*.
3. Mengetahui *Minimum Inhibitory Concentration* ekstrak daun teh hijau yang mampu menghambat bakteri *Streptococcus mutans*.
4. Mengetahui *Minimum Bactericidal Concentration* ekstrak daun teh hijau yang mampu membunuh bakteri *Streptococcus mutans*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan pengetahuan kepada masyarakat tentang aktivitas antibakteri daun teh hijau (*Camellia sinensis L*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.
2. Menambah bukti ilmiah tentang manfaat teh hijau sebagai pengobatan alami baru, efektif, dan terjangkau.
3. Dapat digunakan sebagai salah satu bahan alternatif yang dapat digunakan untuk mencegah terjadinya karies gigi.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teh

2.1.1 Pengertian Teh

Teh merupakan minuman yang sudah dikenal dengan luas di dunia yang diperkenalkan di Indonesia pada tahun 1686 oleh seorang ahli botani sekaligus dokter dari Belanda bernama Andreas Cleyer (Rossi, 2010). Teh merupakan bahan minuman penyegar dan minuman yang menyehatkan dan merupakan salah satu komoditi unggulan perkebunan Indonesia. Teh dikonsumsi sejak 400 tahun yang lalu, dimana terdapat 600 varietas yang tersebar di 30 negara, baik di negara tropis maupun sub tropis termasuk di Indonesia.

2.1.2 Klasifikasi Teh

Saat ini di Indonesia dikenal dengan tiga jenis teh, yaitu teh hijau, teh oolong, dan teh hitam (Faramayuda, 2010). Perbedaan pada ketiganya terletak pada cara pemrosesannya setelah daun teh dipetik (Sundari *et al.*, 2009). Semakin lama proses fermentasi yang dilakukan, maka warna daun yang hijau akan berubah menjadi coklat dan pada akhirnya menjadi kehitaman (Sundari *et al.*, 2009). Teh hijau merupakan teh yang dalam proses pembuatannya tidak mengalami fermentasi. Teh hijau diperoleh melalui pemanasan dan penguapan. Teh oolong merupakan teh yang mengalami semi fermentasi, yaitu diproses melalui pemanasan daun dalam waktu singkat setelah proses penggulungan. Teh hitam merupakan teh yang pada proses pembuatannya mengalami fermentasi penuh. Perbedaan pengolahan menimbulkan adanya perbedaan yang cukup berarti, yaitu dalam kandungan zat aktifnya terutama polifenol. Daun teh hijau memiliki kandungan polifenol tertinggi, kemudian teh oolong, dan terakhir teh hitam (Widyaningrum, 2013).

2.1.3 Taksonomi Teh

Secara taksonomi, tanaman teh hijau menurut Widyaningrum, (2013) diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Sub Kelas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Guttiferales (Clusiales)</i>
Familia	: <i>Camelliaceae (Theaceae)</i>
Genus	: <i>Camellia</i>
Spesies	: <i>Camellia sinensis</i>
Varietas	: <i>Assamica</i>

2.1.4 Morfologi Teh

Daun teh memiliki ciri-ciri:

- Daun teh memiliki bau khas aromatik,
- Daun teh memiliki helai-helai daun yang cukup tebal, kaku, berbentuk melebar sampai memanjang, panjang daunnya tidak lebih dari 5 cm, dan bertangkai pendek,
- Permukaan daun teh bagian atas mengkilat, dan pada daun muda permukaan bawahnya berambut dan jika telah tua menjadi licin,
- Tepi daun teh bergerigi, agak tergulung ke arah bawah (Kartasapoetra, 1992).



Gambar 2.1 Tanaman teh (Djimandkk, 1996)

2.1.5 Kandungan Teh

Daun teh memiliki kandungan zat kimia yang dapat digolongkan menjadi empat kelompok, yaitu senyawa fenol (polifenol, flavanol), senyawa bukan fenol (karbohidrat, pektin, alkaloid, protein dan asam amino, klorofil, asam organik, resin, vitamin, dan mineral), enzim, dan senyawa aromatis (Widyaningrum, 2013).

a. Senyawa Fenol

1) Polifenol

Polifenol merupakan senyawa yang paling umum dan banyak ditemukan pada bunga, tanaman, dan buah-buahan (Antonio *et al.*, 2011). Di dalam kandungan polifenol terdapat senyawa flavonoid, lignin, tannin, camarin, dll (Furiga *et al.*, 2009).

2) Flavanol

Flavanol merupakan antioksidan alami yang terdapat dalam tanaman pangan dan memiliki kemampuan untuk mengikat logam. Flavanol yang terdapat pada teh diantaranya adalah kaemferol, kuersetin, dan mirisetin (Kusuma, 2009).

b. Senyawa Bukan Fenol

1) Karbohidrat

Pada daun teh terdapat karbohidrat yang meliputi sukrosa, glukosa, dan fruktosa. Peranan karbohidrat pada pengolahan teh yaitu bereaksi dengan asam-asam

amino dan polifenol sehingga pada suhu yang tinggi akan membentuk senyawa aldehid yang nantinya akan menyebabkan timbulnya aroma (Towaha *et al.*, 2013).

2) Pektin

Saat pengolahan teh, pektin terurai menjadi asam pektat dan metil alkohol, dan sebagian dari metil alkohol akan menguap ke udara dan sebagian lainnya bereaksi dengan asam-asam organik menjadi ester yang menyusun aroma (Towaha *et al.*, 2013).

3) Alkaloid

Seduhan teh memiliki sifat menyegarkan, sifat menyegarkan dari teh ini berasal dari senyawa alkaloid yang ada di dalam daun teh. Senyawa-senyawa utama yang terdapat dalam senyawa alkaloid daun teh adalah kafein, theobromin, dan theofolin (Towaha *et al.*, 2013).

4) Protein dan Asam Amino

Kandungan protein dalam daun teh berperan dalam pembentukan aroma. Pada proses pelayuan terjadi penguraian protein menjadi asam-asam amino. Kandungan protein dan asam amino pada daun teh sekitar 1,4-5 % dari berat kering daun (Towaha *et al.*, 2013).

5) Klorofil dan Zat Warna yang Lain

Klorofil sangat berperan dalam pemberian warna hijau pada teh hijau, karena salah satu unsur penentu kualitas dari teh hijau yaitu dari warnanya. Kandungan zat warna yang terdapat dalam daun teh sekitar 0,019 % dari berat kering daun (Towaha *et al.*, 2013).

6) Asam organik

Asam organik yang terkandung dalam daun teh yaitu asam sitrat, asam malat, asam suksinat, dan asam oksalat. Kandungan asam organik dalam daun teh sekitar 0,5-2 % dari berat daun kering. Asam organik dapat menyebabkan aroma yang enak karena dalam proses pengolahannya asam organik bereaksi dengan metil alkohol membentuk senyawa ester (Towaha *et al.*, 2013).

c. Senyawa Aromatis

Aroma merupakan hal penting sebagai salah satu penentu kualitas teh. Aroma tersebut didapat dari substansi aromatis yang terkandung dalam daun teh. Substansi aromatis pembentuk aroma merupakan senyawa yang mudah menguap baik pada daun teh maupun dari teh yang terbentuk sebagai hasil reaksi biokimia pada proses pengolahan teh. Substansi aromatis yang terkandung pada daun teh yang masih alami (belum dalam proses pengolahan) jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan yang terbentuk pada saat proses pengolahan teh (Towaha *et al.*, 2013).

d. Enzim

Enzim yang terkandung dalam daun teh berperan sebagai biokatalisator yang artinya senyawa tersebut mempercepat reaksi kimia, namun zat itu sendiri tidak ikut bereaksi, beberapa enzim yang terdapat dalam daun teh diantaranya adalah invertase, amilase, β -glukosidase, oksimetilase, protease, dan peroksidase. Selain itu, terdapat enzim yang berperan dalam proses pengolahan teh pada proses oksidasi katekin yaitu enzim polifenol oksidase (Towaha *et al.*, 2013).

2.2 Mekanisme Daya Antibakteri

Perlekatan sel bakteri pada permukaan gigi merupakan tahap penting pada terjadinya karies gigi. Jika tahapan perlekatan sel bakteri pada permukaan gigi diganggu, maka proses terjadinya karies akan terhenti (Ferrazzano *et al.*, 2009).

Polifenol merupakan salah satu senyawa yang paling banyak terdapat pada tumbuhan, sayur, dan buah. Polifenol dapat menghambat perlekatan sel bakteri. Polifenol akan berinteraksi dengan membran protein, enzim, dan lipid mikroba sehingga polifenol mampu mengubah permeabilitas sel dan proton, ion, dan makromolekul dari bakteri menghilang sehingga metabolisme dari bakteri akan terganggu (Ferrazzano *et al.*, 2009).

Secara spesifik mekanisme antibakteri terdiri dari tiga macam:

a. Mengganggu membran sitoplasma bakteri

Secara pasif, polifenol masuk ke dalam membran sitoplasma bakteri sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran sel, dan kebocoran zat-zat penting yang terdapat di dalam bakteri, seperti protein, asam nukleat, ion-ion seperti potasium dan fosfat (Johnson dalam Campos *et al.*, 2004). Akibat terjadinya kebocoran di dalam sitoplasma bakteri ini mengakibatkan kerusakan atau kematian sel (Brokks *et al.*, 2008).

b. Menghambat adhesi bakteri

Polifenol dapat menghambat aktivitas enzim *Glucosyltransferase*, yang menyebabkan proses terbentuknya glukosa alfa 1-6 dan glukosa alfa 1-3 yang fungsinya sebagai perlekatan bakteri pada plak gigi menjadi terhambat, sehingga akan mengurangi daya adhesi bakteri terhadap permukaan gigi (Ferrazzano *et al.*, 2011).

c. Menyebabkan denaturasi protein bakteri

Polifenol memiliki peran sebagai racun protoplasma bagi bakteri. Saat masuk secara pasif ke dalam sitoplasma bakteri, polifenol bekerja menghambat perpindahan ion proton (H^+) membran *F-ATPase* akan menyebabkan tingkat keasaman di dalam sitoplasma meningkat (Duarte *et al.*, 2006) sehingga terjadi denaturasi protein sehingga bakteri menjadi lisis (Champos *et al.*, 2004).

2.3 *Streptococcus mutans*

2.3.1 Taksonomi *Streptococcus mutans*

Secara taksonomi, *Streptococcus mutans* menurut Gani *et al.*, 1998 diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Firmicutes
Divisio	: Bacilli
Class	: Lactobacilalles
Family	: Streptococcaceae
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Species	: <i>Streptococcus mutans</i>

2.3.2 Morfologi *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan bakteri positif, fakultatif anaerob yang berbentuk *cocci* (bulat) tunggal, ovoid, dan susunannya seperti rantai (Lee *et al.*, 2006). Pada umumnya, warna dari bakteri *Streptococcus mutans* adalah putih, abu-abu, dan kuning. Untuk diamteranya sendiri berukuran sekitar 0,5-2,0 mm. *Streptococcus mutans* sendiri memiliki *water soluble glucan* (cairan) yang berada di atas koloni, atau puddle polisakarida yang mengelilingi koloni bakteri *Streptococcus mutans* (Dworkin *et al.*, 2006).



Gambar 2.2 *Streptococcus mutans* (Kunkel, 2006)

2.3.3 Habitat *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan flora normal yang berada pada mulut, faring, dan *intestine* manusia (Forssten *et al.*, 2010). Mulut merupakan lingkungan untuk pertumbuhan mikroorganisme, karena mulut memiliki sifat yang lembab, dan hangat. *Streptococcus mutans* pada rongga mulut banyak ditemukan pada plak gigi dan pada lesi karies (Simon, 2007). *Streptococcus mutans* akan menjadi lebih retentif jika terletak pada pada lesi karies di daerah pit, dan fissure terutama pada oklusal gigi molar (Loesche *et al.*, 1975; Balakrishnan *et al.*, 2000).

2.3.4 Patogenitas *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans merupakan bakteri penyebab utama terjadinya karies gigi. Hal ini terjadi karena *Streptococcus mutans* memiliki kemampuan melekat pada

permukaan gigi yang menghasilkan asam (Hamada *et al.*, 1980). Asam yang dihasilkan oleh *Streptococcus mutans* ini didapat melalui kemampuan bakteri untuk memetabolisme berbagai karbohidrat seperti amilum dan sukrosa (Ferrazzano *et al.*, 2009).

Streptococcus mutans memiliki berbagai macam produk yang dapat meningkatkan koloninya pada plak gigi dan dapat meningkatkan perkembangan karies. Perlekatan antara *Streptococcus mutans* pada permukaan gigi di perantarai oleh ekstraseluler glukan yang disintesis melalui sukrosa. Sintesa sukrosa yang dilakukan oleh *Streptococcus mutans* menghasilkan enzim *glucosyl transferase* (Thea *et al.*, 1997).

a. Sintesis *glucosyl transferase*

Adhesi *Streptococcus mutans* pada permukaan gigi ada 2 tahapan, yaitu tahap yang pertama tahapan *reversible*. Tahapan *reversible* merupakan tahapan dimana bakteri *Streptococcus mutans* melekat secara *reversible* pada pelikel enamel gigi. Selanjutnya tahapan yang kedua yaitu tahapan *irreversible sucrose-dependent*, yaitu ketika sukrosa ada maka *Streptococcus mutans* akan memproduksi *glucosyl transferase* yang berguna untuk menggabungkan sukrosa dan senyawa karbohidrat lainnya menjadi glukan alfa 1-6 dan glukan alfa 1-3 dan memiliki peran dalam proses perlekatan bakteri pada permukaan gigi, dan pembentukan awal *dental plaque* (Thea *et al.*, 1997).

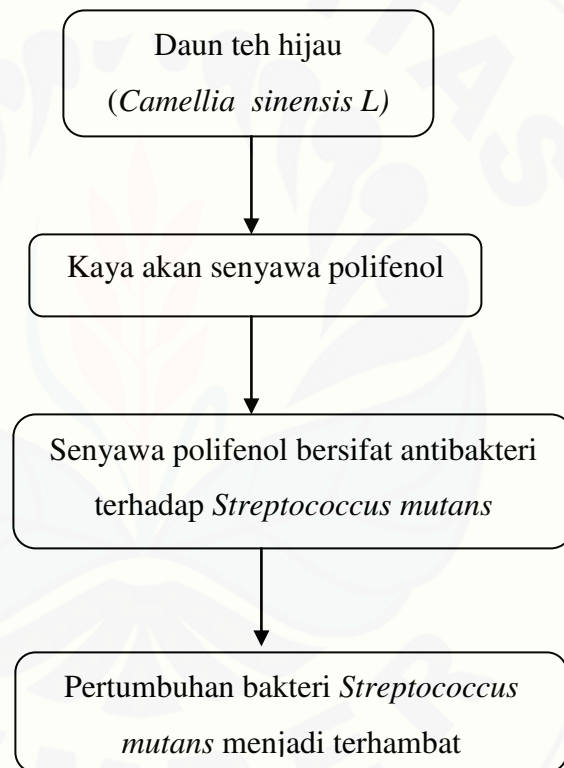
b. Membran Sel

Membran sel dari *Streptococcus mutans* terdiri dari lemak dan protein, sifat dari membran sel ini semipermeabel yang fungsinya untuk mengatur keluar masuknya molekul dan ion (Setiawati, *et al.*, 2007). Bentuk membran sel bakteri ini adalah mesosom, mesosom ini menghadap sitoplasma sehingga sering berkelompok dengan DNA, sehingga peran dari mesosom yaitu sebagai perlekatan DNA (Yuwono, 2009).

c. Laktat Dehidrogenase

Laktat Dehidrogenase memiliki peran untuk memfermentasi sukrosa, glukosa, laktosa, dan memproduksi asam laktat. Asam laktat ini memiliki peran penting dalam pembentukan karies, karena merupakan asam yang paling kuat dan jumlah yang paling banyak yang dihasilkan oleh bakteri *Streptococcus mutans*.

2.4 Kerangka Berpikir



2.5 Hipotesis

Ekstrak daun teh hijau memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* dan kemampuan membunuh bakteri *Streptococcus mutans*.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian ini *posttest only control group design* yaitu dengan membandingkan efek antibakteri ekstrak daun teh hijau pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah diberi suatu tindakan (Notoadmodjo, 2002).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2015.

3.2.2 Tempat Penelitian

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Aktivitas ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56%.

3.3.2 Variabel Terikat

Pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

3.3.3 Variabel Terkendali

- a. Cara pembuatan ekstrak daun teh hijau.
- b. Konsentrasi ekstrak daun teh hijau.
- c. Konsentrasi suspensi bakteri *Streptococcus mutans*.
- d. Alat dan cara pengukuran.

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 Ekstrak Daun Teh Hijau

Ekstrak daun teh hijau adalah substansi yang terkandung dalam teh hijau dan terdiri dari beberapa senyawa fenol. Pada penelitian ini, ekstrak daun teh hijau didapatkan dari ekstraksi teh hijau dengan metode maserasi. Teh hijau ditimbang 5 gram dan ditambahkan dengan etanol 96% sebanyak 25 ml. Campuran teh hijau dan etanol 96% ini diaduk dan direndam selama 3x24 jam. Filtrat hasil ekstraksi disaring.

3.4.2 *Minimum Inhibitory Concentration* Ekstrak Daun Teh Hijau terhadap *S. mutans*

Minimum Inhibitory Concentration dari ekstrak daun teh hijau yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans* yaitu setelah inkubasi selama 24 jam dan 48 jam pada suhu 37⁰C. MIC ditetapkan dengan melihat kejernihan pada media BHI-B pada tabung reaksi secara visual yang dilakukan oleh tiga orang pengamat. Kejernihan pada media BHI-B menunjukkan terhambatnya bakteri. Sedangkan kekeruhan pada media BHI-B menunjukkan tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri.

3.4.3 *Minimum Bactericidal Concentration* Ekstrak Daun Teh Hijau terhadap *S. mutans*

Minimum Bactericidal Concentration dari ekstrak daun teh hijau yang dapat membunuh bakteri *S. mutans* yaitu setelah di inkubasi selama 24 jam dan 48 jam pada suhu 37⁰C. MBC ditetapkan dengan melihat perubahan warna pada media *blood agar* menjadi warna hijau. Tidak adanya perubahan warna pada media *blood agar* menunjukkan bakteri tidak dapat tumbuh. Sedangkan perubahan warna menjadi warna hijau pada media *blood agar* menunjukkan bakteri masih dapat tumbuh.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

- a. Tabung reaksi steril (Pyrex, German).
- b. Tabung erlenmeyer (Pyrex, German).

- c. Autoclave (Memert, German.)
- d. Inkubator (Binder, German).
- e. Pipet Mikroliter (Eppendorf, German).
- f. Pinset (SMC, China).
- g. Spatula.
- h. Kertas Label.
- i. Thermolyne (Maximix II, German).
- j. Beaker Glass.
- k. Evaporator.
- l. Centrifuge.
- m. Agar Nutrien.
- n. Spektrofotometer (Miton Roy, German).
- o. Petridish (Pyrex, German).

3.5.2 Bahan

- a. Teh hijau (Rolas, Kebun Gunung Gambir, Jember-Indonesia).
- b. Aquadest steril (PT Aditama Raya Farmino, Surabaya-Indonesia).
- c. *Streptococcus mutans*
- d. Brain Hearth Infusion Broth (El-Merck, German).
- e. Etanol 96%.
- f. Blood Agar Base (El-Merck, German).
- g. Darah Manusia

3.6 Sampel Penelitian

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi beberapa kelompok perlakuan, yaitu :

- a. Kelompok I : kontrol (BHI-B).
- b. Kelompok II : ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 100%.

- c. Kelompok III : ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 50%.
- d. Kelompok IV : ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 25%.
- e. Kelompok V : ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 12,5%.
- f. Kelompok VI : ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 6,25%.
- g. Kelompok VII : ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 3,13%.
- h. Kelompok VIII : ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 1,56%.

Konsentrasi sampel *S. mutans* pada uji *Minimum Inhibitory Concentration* adalah sesuai dengan standard kekeruhan McFarland 0,5 yaitu sekitar 3×10^6 CFU/mL. Jumlah sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus perhitungan jumlah sampel menurut Federer (Supranto, 2000) :

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

Keterangan :

n : jumlah pengulangan

t : jumlah perlakuan

Penghitungan jumlah sampel penelitian sebagai berikut :

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

$$(n-1) \times (8-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times 7 \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14=3$$

Jadi jumlah ulangan pada penelitian kali ini adalah 3 kali pengulangan dengan jumlah sampel sebanyak 24 sampel.

3.7 Cara Kerja Penelitian

3.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau

Pembuatan ekstrak daun teh hijau dilakukan dengan cara ekstraksi dengan metode maserasi. Teh hijau ditimbang sebanyak 5 gram dan dimasukkan ke dalam *beaker glass*, ditambahkan dengan etanol 96% sebanyak 25 ml dan diaduk, kemudian direndam selama 3x24 jam pada suhu ruang. kemudian diaduk selama 30 menit dan disentrifus untuk memisahkan filtrat A dan residu. Residu diekstrakkan kembali untuk mengoptimalkan pengambilan senyawa yang ada di dalam teh hijau dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 25 ml, kemudian diaduk dan diambil filtrat B. Filtrat A dan filtrat B dicampur dan disaring menggunakan kertas saring dan didapatkan larutan teh hijau. Larutan teh hijau kemudian di evaporasi menggunakan evaporator untuk mendapatkan ekstrak teh hijau yang pekat (Rumiantin, 2011).

3.7.2 Pembuatan Media Kultur

a. Pembuatan *Brain Hearth Infusion Broth* (BHI-B)

Campur 3,7 gram bubuk BHI-B dan 100 ml aquadest steril dalam tabung *erlenmeyer*, aduk dengan spatula hingga homogen. Panaskan hingga suhu 121⁰C. Sterilkan dalam autoklave pada suhu 121⁰C selama 15 menit (Risnawati,2008).

b. Pembuatan Media *Blood Agar*

Campur 40 gram bubuk *Blood Agar Base* dengan 1000 ml aquadest steril.di dalam *erlenmeyer*, aduk hingga homogen. Panaskan hingga suhu 121⁰C. Letakkan pada autoklave pada suhu 121⁰ selama 15 menit. Dinginkan pada suhu 50⁰C, tambahkan 5% darah domba kemudian diaduk dan dituangkan ke dalam petridish.

3.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri uji *Streptococcus mutans* dibiakkan pada media agar nutrien miring dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Diambil 1 ose bakteri *Strptococcus mutans* masukkan ke dalam tabung yang berisi 5ml NaCl dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C dan diperoleh suspensi bakteri (Fuad, 2014).

Hasil dari pembiakan bakteri *Streptococcus mutans* diambil 1 ose kemudian dicampurkan dengan 2 cc BHI-B ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Kemudian suspensi *Streptococcus mutans* diambil dari inkubator, dikocok hingga homogen dengan menggunakan spatula. Diukur tingkat kekeruhannya dengan menggunakan spektrofotometer hingga didapatkan tingkat kekeruhan 0,5 MacFarland, yaitu 3×10^6 CFU/ML (Raihana, 2011).

3.7.4 Uji *Minimum Inhibitory Concentration*

Untuk menguji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak daun teh hijau digunakan metode dilusi cair / *broth dilution test*. Cara yang dilakukan adalah dengan membuat pengenceran bertingkat dengan ekstrak daun teh hijau pada medium cair (BHI-B) yang ditambahkan dengan *Streptococcus mutans* (Pratiwi, 2008). Konsentrasi ekstrak daun teh hijau yang digunakan pada penelitian ini adalah 100%, 50%, dan 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, dan kontrol (Azahar, 2014).

Tahapan uji MIC adalah:

- a. Tabung steril disiapkan.
- b. Tabung 1 diisi 2 ml sampel ditambahkan dengan 1 mL BHI-B (disebut tabung P100, dengan konsentrasi ekstrak 100%).
- c. Tabung 2 diisi 1ml P100 ditambahkan dengan 1 mL BHI-B (disebut tabung P50, dengan konsentrasi ekstrak 50%).
- d. Tabung 3 diisi 1ml P50 ditambahkan dengan 1 mL BHI-B (disebut tabung P25, dengan konsentrasi ekstrak 25%).
- e. Tabung 4 diisi 1ml P25 ditambahkan dengan 1 mL BHI-B (disebut tabung P12,5, dengan konsentrasi ekstrak 12,5%).
- f. Tabung 5 diisi 1ml P12,5 ditambahkan dengan 1 mL BHI-B(disebut tabung P6,25, dengan konsentrasi ekstrak 6,25%).
- .g. Tabung 6 diisi 1 ml P6,25 ditambahkan dengan 1 mL BHI-B (disebut tabung P3,13, dengan konsentrasi ekstrak 3,13%).

- h. Tabung 7 diisi 1 ml P3,13 ditambahkan dengan 1 mL BHI-B (disebut tabung P1,56, dengan konsentrasi ekstrak 1,56%).
- i. Tabung 8 diisi 1ml BHI-B (sebagai kontrol).

Kedelapan tabung ditambahkan dengan *S mutans* 0,1 mL dan diaduk menggunakan *thermolyne*, kemudian di inkubasi selama 24 jam dan 48 jam dengan suhu 37⁰C kemudian dilihat konsentrasi terendah dimana tidak terdapat pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan jernihnya tabung reaksi (ditentukan oleh 3 orang pengamat) (Pratiwi, 2008). Pengulangan uji MIC dilakukan sebanyak tiga kali.

3.7.5 Uji *Minimum Bactericidal Concentration*

Untuk menguji MBC ekstrak daun teh hijau digunakan media *blood agar* yang merupakan media *differensial* dan media penyubur pada *S. mutans* (Pratiwi, 2009:117). Konsentrasi ekstrak daun teh hijau yang digunakan pada penelitian kali ini adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, dan 1,56%.

- a. Setelah dilakukan uji MIC, sediaan uji diambil sebanyak 1 μ L, kemudian ditanam pada media *blood agar*.
- b. Media diinkubasi pada suhu 37⁰ C, selama 24 jam dan 48 jam. Kemudian diamati hingga konsentrasi terendah yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada media *blood agar* menjadi warna hijau. Jika pada media *blood agar* terjadi perubahan warna menjadi warna hijau, ekstrak daun teh hijau tidak dapat membunuh bakteri (Ingle *et al.*, 2008).

Hasil dari pengamatan tersebut ditetapkan sebagai MBC. Pengulangan uji MBC ekstrak daun teh hijau terhadap *S. mutans* dilakukan sebanyak tiga kali.

3.8 Analisis Data

Hasil data pada uji MIC dan MBC berupa data nonparametrik, yakni data nominal, sehingga analisa data dilakukan dengan menggunakan uji data nonparametrik lebih dari dua sampel bebas yakni menggunakan uji data *Kruskall-Wallis*. Terdapat perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan menggunakan uji data *Mann-Whitney*.

3.9 Alur Penelitian

