

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN
BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP
Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)**



Oleh:

**Ani Wijayanti
19133955A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN
BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi L.*) TERHADAP
Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)**



SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
Derajat sarjana farmasi (S.Farm)
Program Studi Ilmu Farmasi Pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Ani Wijayanti
19133955 A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI
berjudul

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING
WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Methicillin Resistant*
Staphylococcus aureus (MRSA)**

Oleh:

Ani Wijayanti
19133955 A

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada Tanggal : 12 Juni 2017

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan



Prof. Dr. R. Oestari, SU., M.M., M.Sc., Apt

Pembimbing Utama

Dr. Ana Indrayati, M.Si

Pembimbing Pendamping

Drs. Mardiyono, M.Si
Penguji:

1. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt.

1.

2. Fransiska Leviana, S.Farm., M.Sc., Apt.

2.

3. Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M.Sc.

3.

4. Dr. Ana Indrayati, M.si

4.

PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Mei 2017

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large oval shape followed by a vertical line with a hook at the top and a small vertical stroke at the bottom.

Ani Wijayanti

HALAMAN PERSEMBAHAN

“ Jangan mengeluhkan hal-hal buruk yang datang dalam hidupmu. Tuhan tak pernah memberikannya, kamulah yang membiarkannya datang“

(R.A. Kartini)

“ Orang bilang halangan, kita bilang tantangan. Orang bilang hutan rimba, kita bilang jalan raya. Orang bilang nekat, kita bilang nikmat. Orang bilang jalan buntu, kita bilang mainan baru“

(Anonim)

“ Some people feel the rain, others just get wet ”

“Though the road is been rocky it sure feels good to me”

(Bob Marley)

Sebuah persembahan untuk keluargaku tercinta

Untuk “NDORO” semoga setiap tetes keringat dan lelah yang

kau terima digantikan surga oleh Tuhan

dan spesial untuk almarhum Bapak “semoga engkau mendapat

kebagiaan disurga yang belum sempat aku wujudkan di dunia”.

“BIG THANKS FOR ALL, LOVE YOU”

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT Tuhan semesta alam Sang Pemberi Rizki dan kesempatan, atas magfirah dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)**”. Skripsi ini disusun guna memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

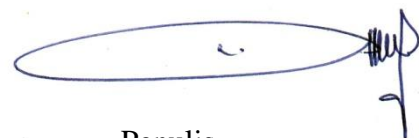
Penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, baik secara moril maupun materiil. Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Allah SWT beserta alam semesta seisinya.
2. Dr. Djoni Tarigan, MBA selaku Rektor Universitas Setia Budi.
3. Prof. DR. R.A. Oetari, SU., MM., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si. selaku Pembimbing Utama dan Drs. Mardiyono, M.Si. selaku Pembimbing Pendamping yang telah berkenan mengorbankan waktunya guna membimbing, memberi nasehat, dan mengarahkan penulis pada saat penelitian dan penyusunan skripsi.
5. Dra. Nony Puspawati dan Samuel Budi Harsono, M.Si., Apt yang telah berkenan mengorbankan waktunya guna membimbing penulis dalam menyelesaikan penelitian dan, memberikan dukungan secara moril kepada penulis.
6. Opataria Saptarini, M.Si., Apt, Fransiska Leviana, S.Farm., M.Sc., Apt, Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M.Sc selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan demi kesempurnaan dalam skripsi ini.
7. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi.
8. Seluruh Staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

9. Bapak Mun, ndoro Sri, mas Aris, dek Ferdi serta seluruh keluarga lainnya yang telah memberikan pengorbanan, nasehat, pengertian, dan dukungan moril maupun materiil, serta semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini.
10. Rekan penelitian dan inil-inil together Dwi Suistiyowati atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyelesaikan penelitian skripsi ini.
11. Rekan gibah solekah Maria Wijanarko, Echa Rere dan “Sedulur and genk” atas semangat untuk segera menyelesaikan skripsi ini, terimakasih untuk tempat kost yang nyaman Bapak dan Ibu Darmadi.
12. Ibu kantin buat kopi hitam terenak yang setia menemani selama ini dan big thanks to “Payung Teduh” yang lagu-lagunya selalu sukses bikin adem pikiran.
13. Teman-teman seperjuanganku FKK 4, Teori 4, teman teman KKN dan teman-teman S1 Farmasi yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu, serta semua pihak yang telah membantu kelancaran proses skripsi ini.

Akhir kata penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan oleh karena itu, penulis menerima kritikan atau saran yang bersifat membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan di bidang ilmu farmasi khususnya obat tradisional Indonesia.

Surakarta, April 2016



Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
PENGESAHAN SKRIPSI	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Tanaman Belimbing Wuluh	4
1. Sistematika tanaman.....	4
2. Nama lain belimbing wuluh	4
3. Morfologi tanaman belimbing wuluh.....	5
4. Kandungan kimia	5
4.1. Flavonoid.....	5
4.2. Saponin	7
4.3. Tanin.....	7
5. Manfaat tanaman belimbing wuluh.....	7
B. Simplisia	8
1. Pengertian simplisia	8
2. Pencucian dan pengeringan simplisia.....	8
C. Metode Penyarian	9
1. Ekstraksi	9
2. Maserasi.....	9

3.	Pelarut.....	10
D.	Media.....	10
E.	Sterilisasi	11
F.	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.	Sistematika <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.	Morfologi dan Identifikasi.....	12
3.	Patogenesis	13
4.	<i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i>	14
G.	Aktivitas Antibakteri	14
1.	Antibakteri.....	14
2.	Mekanisme kerja antibakteri	15
3.	Mekanisme resistensi	16
4.	Resistensi terhadap betalaktam	18
H.	Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri	19
I.	Vankomisin.....	20
J.	Landasan Teori	21
K.	Hipotesis	22
BAB III METODE PENELITIAN		24
A.	Populasi dan Sampel.....	24
1.	Populasi	24
2.	Sampel	24
B.	Variabel Penelitian	24
1.	Identifikasi Variabel Utama	24
2.	Klasifikasi variabel utama	24
3.	Definisi operasional variabel utama	25
C.	Alat dan Bahan	26
1.	Alat	26
2.	Bahan.....	26
2.1	Bahan sampel	26
2.2	Bahan kimia	26
D.	Jalannya Penelitian	27
1.	Determinasi daun belimbing wuluh	27
2.	Pengambilan sampel.....	27
3.	Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh.....	27
4.	Kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh.....	27
5.	Pembuatan ekstrak etanol.....	28
6.	Tes bebas etanol daun belimbing wuluh	28
7.	Identifikasi kandungan senyawa kimia	28
7.1	Identifikasi flavonoid	28
8.	Sterilisasi	29
9.	Pembuatan suspensi bakteri uji	29
10.	Identifikasi bakteri uji	29
10.1	Identifikasi morfologi koloni dengan media VJA.....	29
10.2	Pewarnaan Gram	29
10.3	Identifikasi biokomia	30

10.4 Uji hemolisis.....	30
10.5 Uji sensitivitas MRSA terhadap antibiotik oksasillin, sefoksitin dan vankomisin.....	30
11. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh.....	31
12. Analisis Hasil	32
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	 36
A. Hasil Penelitian.....	36
1. Identifikasi Tanaman Belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.)	36
2. Pengumpulan bahan dan pengeringan.....	36
3. Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh.....	37
4. Penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh	37
5. Pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh.....	38
6. Tes bebas etanol ekstrak maserasidaun belimbing wuluh.....	39
7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh	40
8. Identifikasi bakteri uji MRSA	40
9. Uji sensitivitas MRSA terhadap antibiotik	42
10. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh.....	44
 BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	 49
A. Kesimpulan.....	49
B. Saran	49
 DAFTAR PUSTAKA	 50
 LAMPIRAN.....	 55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tanaman belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i> L.)	4
Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh	33
Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi	34
Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap MRSA dengan metode dilusi.....	35

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1.	Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh	37
Tabel 2.	Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh	38
Tabel 3.	Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun belimbing wuluh.....	39
Tabel 4.	Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi daun belimbing wuluh.....	39
Tabel 5.	Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun belimbing wuluh secara kualitatif.....	40
Tabel 6.	Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan koagulase	42
Tabel 7.	Hasil uji sensitivitas MRSA terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, dan vankomisin.....	43
Tabel 8.	Hasil uji sensitivitas ekstrak daun belimbing wuluh terhadap MRSA secara difusi	44
Tabel 9.	Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA dengan metode dilusi.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Keterangan Determinasi Tanaman belimbing wuluh.....	56
Lampiran 2. Gambar daun belimbing wuluh dan serbuk.....	57
Lampiran 3. Gambar maserasi, penyaringan, pemekatan dan ekstrak kental	58
Lampiran 4. Gambar timbangan, mesin penggiling simplisia dan vortex	59
Lampiran 5. Gambar alat inkubator, autoklaf dan <i>moisture balance</i>	60
Lampiran 6. Foto <i>beaker glass</i> 100 mL, gelas ukur 10 mL, cawan petri dan mikropipet	61
Lampiran 7. Foto <i>yellow tip</i> , spatula dan pinset	62
Lampiran 8. Foto hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak etanol daun belimbing wuluh.....	63
Lampiran 9. Gambar hasil identifikasi makroskopis, mikroskopis, uji biokimia dan uji hemolisis bakteri MRSA	64
Lampiran 10. Gambar uji sensitivitas MRSA terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, vankomisin dan uji sensitivitas <i>S. aureus</i> terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin	65
Lampiran 11. Gambar hasil difusi ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap MRSA dan <i>S. aureus</i>	66
Lampiran 12. Gambar hasil dilusi dan inokulasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap MRSA	67
Lampiran 13. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah, persen rendemen kadar lembab serbuk dan persen rendemen ekstrak daun belimbing wuluh.....	68
Lampiran 14. Pembuatan larutan ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 40%, 60%, dan DMSO 1%.....	69
Lampiran 15. Standar kekeruhan <i>Mc Farland</i> dan tabel <i>Interpretive Standards Kirby Bauer</i>	70

Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media.....	71
-------------------------------------------------	----

INTISARI

WIJAYANTI, A., 2017 AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus adalah bakteri *S. aureus* yang mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan beta laktam. Hal ini dikarenakan terjadi perubahan PBP2 menjadi PBP2a akibat dari penyisipan gen *mecA* pada strain *S. aureus*. MRSA merupakan bakteri penyebab beberapa masalah kesehatan diberbagai rumah sakit di dunia. Beberapa infeksi yang disebabkan oleh MRSA adalah infeksi pada kulit, tulang, paru dan jantung, selain itu MRSA merupakan penyebab utama terjadinya infeksi nosokomial. Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*L.) mengandung flavonoid, saponin, dan tanin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.

Ekstraksi daun belimbing wuluh menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun beimbing wuluh terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi dan dilusi. Konsentrasi ekstrak etanol yang digunakan dalam metode difusi adalah 40% dan 60%, sedangkan konsentrasi ekstrak etanol yang digunakan dalam metode dilusi adalah 60%; 30%; 15%; 7,5%; 3,75%; 1,875%; 0,9375%; 0,46875%.

Konsentrasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) yang optimum menghambat pertumbuhan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* adalah konsentrasi 60% dengan luas zona hambat 11 mm, dan Konsentrasi Bunuh Minimum sebesar 15%.

Kata kunci : *Averrhoa bilimbi* L., *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, antibakteri.

ABSTRACT

WIJAYANTI, A., 2017 ANTIBACTERIA ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT WULUH STAR FRUIT LEAF (*Averrhoa bilimbi* [L.]) TOWARDS *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, THESIS, PHARMACHY FACULTY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus is *S. aureus* bacterium experiencing resistance towards antibiotic beta laktam group. It is caused by the change of PBP2 into PBP2a consequences from insertion of *mecA* gene on strain *S. aureus*. MRSA is a bacterium caused many health problems at a lot of hospital in the world. Much infection that is caused by MRSA is infection on skin, bone, lungs, and heart, besides that MRSA is the most caused of nosokomial infection. The chemistry content of wuluh star fruit leaf is flavonoid, saponin, and tannin. This research was done to know the activity of antibateria wuluh star fruit leaf ethanol extract towards *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*.

Wuluh star fruit leaf extract used maserasi method with ethanol 70%. Antibacterial activity experiment of wuluh star fruit leaf extract towards *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* used diffusion method and dilution. Concentrate of ethanol extract which was used in diffusion method is 40% and 60%, and concentrate of ethanol extract which was used for dilution was 60%; 30%; 15%; 7,5%; 3,75%; 1,875%; 0,9375%; 0,46875%.

The result of this study showed that wuluh star fruit leaf ethanol extract (*Averrhoa bilimbi* [L.]) with 60% concentrate had antibacterial activity towards *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* with zone of inhibition diameters amount of 11 mm, and Minimum Kill Concentrate with the amount of 15%.

Key word: (*Averrhoa bilimbi* [L.], *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*, antibacterial

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan yang memiliki angka kejadian cukup tinggi di beberapa rumah sakit di Indonesia maupun di berbagai rumah sakit di dunia, termasuk angka kejadian infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* merupakan bakteri yang sering menjadi masalah dalam bidang kesehatan. Lebih dari separuh infeksi terkait *S. aureus* di pusat-pusat kesehatan disebabkan oleh MRSA. Penyakit yang biasanya disebabkan oleh infeksi MRSA antara lain pneumonia, bakteremia atau septisemia, selulitis, endokarditis, meningitis, dan osteomyelitis. Ruang neonatal dan obstetrik-ginekologi adalah area yang memiliki resiko cukup tinggi untuk terjadinya MRSA. *S. aureus* memiliki kemampuan menjadi resisten terhadap berbagai jenis antibiotik. *S. aureus* yang telah menjadi resisten terhadap metisilin atau yang sekarang di kenal dengan *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Kusuma 2009).

MRSA ditemukan sejak tahun 1961 dan terjadinya epidemik pertamanya di Amerika Serikat pada tahun 1968 sampai sekarang menjadi masalah utama infeksi nosokomial di rumah sakit. Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang disebabkan oleh bakteri, parasit, atau virus dirumah sakit, infeksi ini timbul sekurang-kurangnya 72 jam sejak masuk rumah sakit. Infeksi ini terjadi akibat kurang bersihnya lingkungan perawatan menyebabkan terjadinya infeksi mikroorganisme dari lingkungan ke manusia, infeksi juga dapat karena berpindahnya mikroorganisme dari pasien yang satu ke pasien yang lain. MRSA yang termasuk dalam *emerging infectious pathogen* ini bisa menyebar melalui kontak antara tenaga kesehatan yang terinfeksi atau dengan pasien di rumah sakit (Dzen *et al* 2005). Prevalensi infeksi MRSA di Asia mencapai 70%, sementara di Indonesia pada tahun 2006 prevalensinya mencapai angka 23,5% (Guntur 2007). Berdasarkan penelitian yang baru-baru ini dilakukan di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang terhadap beberapa spesimen klinik seperti, pus, sputum, dan urin

didapatkan 772 isolat *S. aureus*, 38,2% diantaranya merupakan isolat MRSA. Prevalensi tertinggi didapatkan pada tahun 2012 sebesar 43,5%, sedangkan prevalensi terendah pada tahun 2013 sebesar 33,5% (Erikawati *et al* 2016).

Di era sekarang ini banyak tanaman yang dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk mengatasi berbagai penyakit termasuk infeksi, karena banyak orang beranggapan bahwa penggunaan obat tradisional relatif lebih aman dibandingkan dengan obat yang berasal dari bahan kimia. Salah satu diantara tanaman yang dapat digunakan sebagai obat adalah belimbing wuluh. Daun belimbing wuluh mengandung senyawa jenis flavonoid seperti luteolin dan apigenin (Zakaria *et al* 2007). Belimbing wuluh merupakan tumbuhan yang tumbuh hampir di seluruh daerah, namun belum dibudidayakan secara khusus. Tanaman belimbing wuluh dapat dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari. Bagian yang dapat digunakan diantaranya bunga, buah, daun, dan batangnya. Bunga belimbing wuluh dapat digunakan sebagai obat batuk dan sariawan. Buah belimbing wuluh selain digunakan sebagai bumbu masak dapat juga digunakan sebagai obat menurunkan tekanan darah tinggi, gusi berdarah, jerawat dan batuk. Batang belimbing wuluh dapat digunakan sebagai obat sakit perut, sedangkan daunnya selain dapat digunakan sebagai penyedap rasa juga dapat digunakan sebagai obat batuk, obat kompres pada sakit gondokan, obat rematik, obat diare dan juga berpotensi sebagai antibakteri (Sudarsono *et al* 2007).

Penelitian Zakaria *et al.* (2007) menunjukkan bahwa ekstrak air daun belimbing wuluh pada konsentrasi 2 mg/disk dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Pada bakteri Gram positif seperti *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus*, dan *Corynebacterium diphteriae* memiliki diameter zona hambat berturut-turut 8 mm, 7 mm, 13 mm, dan 7 mm, sedangkan bakteri gram negatif seperti *Salmonella typhi*, *Citrobacter fuendii*, dan *Aeromonas hydrophyla* memiliki diameter zona hambat berturut-turut 10 mm, 10 mm, dan 9 mm. Ekstrak kloroform daun belimbing wuluh pada konsentrasi 2 mg/disk mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif seperti *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Kochuria rhizophila*, dan *Corynebacterium diphteriae* dengan diameter zona hambat berturut-turut 11 mm, 16 mm, dan 12 mm dan

Gram negatif seperti *Salmonella typhi* dan *Citrobacter freundii* mempunyai diameter zona hambat 11 mm, dan 9 mm. Penelitian lain yang dilakukan oleh (Pendit *et al*) menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh dengan perbandingan bahan : pelarut (b/v) 1 : 5 merupakan perlakuan terbaik karena memiliki nilai parameter rendemen sebesar 10,45% dan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* sebesar 13,13 mm (Pendit *et al* 2016). Uji terhadap bakteri MRSA belum pernah dilakukan, sehingga dilakukan uji aktivitas dari ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA.

B. Perumusan Masalah

Perumusan masalah dari penelitian ini adalah:

Pertama, apakah ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh dapat menghambat pertumbuhan bakteri MRSA?

Kedua, berapakah nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Maksimum (KBM) dari ekstrak etanol 70% belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA?.

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

Pertama, untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh dalam menghambat pertumbuhan bakteri MRSA

Kedua, untuk mengetahui nilai KHM dan KBM ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan tentang manfaat lain dari daun belimbing wuluh dalam menghambat bakteri MRSA. Sehingga nantinya dapat digunakan sebagai alternatif lain dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri MRSA, dan bermanfaat di dunia kesehatan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Belimbing Wuluh

1. Sistematika tanaman

Kedudukan dalam sistematika tumbuhan (taksonomi), tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Geraniales
Famili	: Oxalidaceae
Genus	: Averrhoa
Spesies	: <i>Averrhoa bilimbi</i> L (Soenarjono 2008).



Gambar 1. Tanaman Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

2. Nama lain belimbing wuluh

Menurut Wijayakusuma 2005, belimbing wuluh di Indonesia memiliki nama berbeda-beda tiap daerahnya, seperti di Aceh belimbing wuluh dikenal dengan limeng, selimeng, thimeng, di Batak dikenal dengan asom, belimbing, balimbingan, di Nias dikenal dengan malimbi, di Minangkabau dikenal dengan balimbieng, di Lampung dikenal dengan balimbing, di Sunda dikenal dengan

calincing, balingbing, di Jawa dikenal dengan belimbing wuluh, di Madura (bhalingbhing bulu), di Bali (blimbing buloh), di Bugis (celene).

3. Morfologi tanaman belimbing wuluh

Adapun morfologi dari tumbuhan ini, memiliki batang yang tidak begitu besar, mempunyai garis tengah sekitar 30 cm, dan tinggi mencapai 10 m. Belimbing wuluh mempunyai batang kasar berbenjol-benjol dan memiliki percabangan sedikit. Cabang muda berambut halus seperti beludru, warnanya coklat muda. Daun berupa daun majemuk menyirip ganjil dengan 21 dengan 45 pasang anak daun. Anak daun bertangkai pendek, bentuknya bulat telur, ujung runcing, pangkal membundar, tepi rata, panjang 2 sampai dengan 10 cm, lebar 1 sampai dengan 3 cm, warnanya hijau, permukaan bawah hijau muda. Perbungaan belimbing wuluh ini berkelompok, keluar dari batang atau percabangan yang besar, bunga kecil-kecil berbentuk bintang, warnanya ungu kemerahan (Wijayakusuma 2005)

Bentuk buah belimbing wuluh adalah bulat lonjong bersegi, panjang 4 sampai dengan 6,5 cm, warnanya hijau kekuningan, bila masak berair banyak, rasanya asam. Buah belimbing wuluh sering digunakan sebagai sirup penyegar, bahan penyedap masakan, membersihkan noda pada kain, mengkilapkan barang-barang yang terbuat dari kuningan, membersihkan tangan yang kotor atau sebagai obat tradisional (Inyu 2006).

4. Kandungan kimia

Kandungan kimia pada belimbing wuluh adalah saponin, glukosida, sulfur, asam format, alkaloid, peroksida, asam amino, asam sitrat, senyawa fenolik, ion kalsium, gula dan vitamin. Menurut Lathifah (2008), identifikasi golongan pada ekstrak etanol dari buah belimbing wuluh menunjukkan adanya senyawa flavonoid, triterpenoid. Daun belimbing wuluh mengandung tanin, sulfur, asam format, dan kalium sitrat (Wijayakusuma 2006). Penelitian pendit dkk (2016) menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin dan tanin.

4.1. Flavonoid. Flavonoid adalah senyawa polifenol yang banyak terdapat di alam. Flavonoid merupakan golongan senyawa bahan alam dari senyawa

fenolik yang banyak merupakan sebagai pigmen tumbuhan. Flavonoid terdapat pada grup-grup pada unsur-unsur polifenol yang terdapat pada kebanyakan tumbuhan, biji, kulit buah, kulit kayu, dan bunga. Sejumlah besar tumbuhan obat mengandung flavonoid, flavon, flavanon, isoflavon, *anthocyanidin*, dan khalkon (Robinson 1995).

Kebanyakan flavonoid terdapat dalam buah, sayuran, dan minuman (teh, kopi, bir, anggur, dan minuman buah). Di alam, senyawa fenolik kerap dijumpai terikat pada protein, alkaloid, dan terdapat diantara terpenoid (Robinson 1991). Flavonoid juga berpengaruh terhadap metabolisme kolesterol secara langsung di hepar. Hipotesis yang mendukung berupa, menurunnya serum kolesterol dan aktivitas *hydroxymethylglutaryl-CoA reductase* dan *enzyme sterol O-acyltransferase-2* pada metabolisme kolesterol setelah pemberian flavonoid pada tikus (Kurnia *et al* 2010).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme antibakteri flavonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkelasi atau ikatan hydrogen dengan menumpuk basa pada asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Dihidroksilasi pada cincin A berperan penting pada aktivitas antibakteri flavonoid. Hal ini menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan lisosom. Kedua, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat fungsi membran sel yaitu dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga dapat merusak membran sel dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Penelitian lain membuktikan flavonoid mengganggu permeabilitas membran sel dan menghambat ikatan enzim ATPase dan fosfolipase. Ketiga, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat metabolisme energi yaitu dengan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat sitokrom C reduktase sehingga proses metabolisme dan biosintesis makromolekuler terhambat (Cushnie 2005).

4.2. Saponin. Saponin yang merupakan produk glikosida alam. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Senyawa ini berdifusi melalui membran luaran dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu serta mengurangi kestabilannya. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Nuria *et al* 2009).

4.3. Tanin. Tanin merupakan kandungan tumbuhan yang bersifat fenol, yang mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit. Kelarutan tanin adalah larut dalam air, tidak larut dalam larutan organik non polar. Tanin yang terkandung dibagian daun belimbing wuluh, mampu mengurangi penyerapan makanan dengan cara mengendapkan mukosa protein yang ada dalam permukaan usus (Robinson 1995).

Tanin didalam tubuh akan berikatan dengan protein tubuh dan akan melapisi dinding usus, sehingga penyerapan lemak dihambat. Selain itu, tanin melindungi usus terhadap asam lemak tak jenuh. Proses perlindungan yang dilakukan tanin berupa pematatan lapisan lender saluran pencernaan sehingga menghambat penyerapan zat-zat makanan (termasuk lemak dan kolesterol) oleh saluran pencernaan. Penelitian tanin diketahui memacu glukosa dan lemak, sehingga timbunan kedua sumber kalori ini dalam darah dapat dihindari, artinya kolesterol dan gula darah dapat turun (Kurnia *et al* 2010).

5. Manfaat tanaman belimbing wuluh

Tanaman belimbing wuluh mempunyai banyak khasiat dan kegunaan mulai daribatang, daun, bunga, dan buah (Depkes 1989). Batang belimbing wuluh dapat digunakan untuk mengobati penyakit gondok. Daun belimbing wuluh yang dilumatkan digunakan untuk mengatasi demam dan obat luar, rebusan daun untuk menanggulangi peradangan usus besar dan mengobati diabetes militus. Gerusan tangkai muda sebagai obat oles pada sakit gondok. Daun mudanya yang dicampur beberapa rempah-rempah dapat digunakan sebagai obat encok, gondong (parotitis), sakit perut, tekanan darah tinggi dan reumatik. Cairan dari bunga untuk obat batuk dan sariawan. Buah dapat menurunkan tekanan darah, sakit gigi

berlubang, jerawat, panu, kelumpuhan, gangguan pencernaan, tekanan darah tinggi dan radang rectum. Buah yang dibuat selai untuk penderita sariawan usus dan memperlancar pengeluaran getah empedu yang kurang baik (Sudarsono *et al* 2002).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman dengan tingkat kehalusan tertentu. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan berupa bahan kimia murni. Simplisia pelikan (mineral) adalah simplisia yang berupa tanaman pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia murni (Gunawan dan Mulyani 2004). Simplisia harus memenuhi persyaratan minimal untuk menjamin keseragaman senyawa aktif, kemampuan maupun kegunaannya. Faktor yang mempengaruhi yaitu bahan baku simplisia, proses pembuatan simplisia termasuk cara penyimpanan bahan baku simplisia dan cara pengepakan (Depkes 2000).

2. Pencucian dan pengeringan simplisia

Pencucian dilakukan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih. Bahan simplisia mengandung zat yang mudah larut dalam air sehingga pencucian harus dilakukan dalam waktu yang secepat mungkin (Prastowo 2013).

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama dan untuk menjamin keawetan dan mencegah timbulnya bakteri serta jamur. Pengeringan secara alamiah dapat dilakukan dengan panas sinar matahari langsung. Cara ini dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu,

biji dan simplisia dengan kandungan senyawa aktif yang relatif stabil apabila terkena panas.

Pengeringan alamiah lainnya adalah dengan cara diangin-anginkan dan tidak dipanaskan di bawah sinar matahari langsung. Cara ini terutama untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga dan daun. Pengeringan simplisia yang dilakukan menggunakan alat pengering yang harus diperhatikan adalah jenis bahan, suhu pengeringan, dan waktu pengeringan, sehingga simplisia tidak mudah rusak dan kandungan kimia yang berkhasiat tidak berubah karena proses fermentasi (Gunawan & Mulyani 2004).

C. Metode Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes 2000). Pemilihan pelarut sangat penting dalam proses ekstraksi sehingga bahan berkhasiat yang akan ditarik secara sempurna (Farouq 2003).

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi produk jadi. Ekstrak sebagai bahan antara berarti masih menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal atau sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita (Depkes 2000).

2. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Prinsip metode ini adalah pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinyu

(terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes 2000).

Maserasi dapat dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, dimasukkan dalam bejana lalu dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk, sari kemudian diencerkan dan ampas diperas. Ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Keuntungan metode maserasi adalah alat yang digunakan sederhana, murah dan mudah dilakukan (Depkes 2000).

3. Pelarut

Pelarut adalah suatu zat untuk melarutkan suatu obat dalam preparat larutan. Pemilihan pelarut yang akan digunakan dalam ekstraksi dari bahan mentah obattertentu berdasarkan daya larut zat aktif dan zat yang tidak aktif (Ansel 1989). Faktor yang dipertimbangkan dalam pemilihan cairan penyari seperti murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisik dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan terbakar, selektif yaitu menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat. Cairan penyari atau pelarut ada tiga macam yaitu pelarut polar, semi polar dan non polar, contoh cairan penyari adalah air, etanol, etanol-air dan air (Depkes 2000).

Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, flavonoid, antrakuinon, steroid, dan klorofil. Lemak, malam, tanin, dan saponin hanya sedikit larut. Etanol dipertimbangkan sebagai larutan penyari karena lebih selektif. Kapang dan kuman kulit tidak dapat tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada skala perbandingan, panas diperlukan lebih sedikit (Depkes 2005).

D. Media

Media adalah tempat mikroba untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang mengandung kehidupan mikroba. Media tumbuh menyediakan berbagai bahan yang diperlukan mikroba untuk hidup dan memperbanyak diri. Mikroba dapat

tumbuh dan berkembang biak dengan baik, jika di dalam media mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, tidak ditumbuhi mikroba lain (Abdurahman 2008).

Bentuk media ditentukan oleh ada tidaknya penambahan zat pematat seperti agar-agar, gelatin, dan sebagainya. Media padat adalah media yang ditambahkan antara 12-15 gram tepung agar-agar per 1000 mL media. Jumlah tepung agar- yang ditambahkan tergantung pada jenis dan kelompok mikroba yang digunakan. Jenis media yang memerlukan kadar air tinggi maka jumlah tepung agar-agar harus kecil, tetapi untuk jenis media yang memerlukan kandungan air rendah maka penambahan tepung harus banyak. Media padat umumnya digunakan untuk bakteri, ragi, jamur, dan kadang-kadang mikroalga.

Media cair apabila kedalam media tidak ditambahkan zat pematat, biasanya media cair digunakan untuk perbanyakan mikroalga dan juga mikroba lain, terutama bakteri dan ragi. Media semi cair atau semi padat apabila penambahan zat pematat hanya 25% atau kurang dari yang seharusnya. Umumnya diperlukan untuk pertumbuhan mikroba yang banyak memerlukan kandungan air dan hidup aerobik atau fakultatif (Suriawiria 2005).

E. Sterilisasi

Bahan atau peralatan yang dipergunakan dalam bidang mikrobiologi harus dalam keadaan steril. Sterilisasi merupakan suatu proses untuk membunuh semua jasad renik yang ada, sehingga jika ditumbuhkan di dalam suatu medium tidak ada lagi jasad renik yang dapat berkembang biak. Sterilisasi harus dapat membunuh jasad renik yang paling tahan panas seperti bakteri. Sterilisasi dengan autoklaf biasanya disebut sterilisasi basah atau sterilisasi uap yang mudah diangkat dengan menggunakan uap air jenuh bertekanan pada suhu 121°C disebabkan oleh tekanan 1 atm. Metode selain dengan menggunakan sterilisasi basah juga dapat menggunakan metode lainnya seperti perebusan, tyndalisasi, pasteurisasi,

pemanasan kering, radiasi, radiasi ionisasi, penyaringan, dan lain-lain (Fardiaz 2001).

Cara sterilisasi yang umum dilakukan meliputi sterilisasi secara fisik yaitu pemanasan basah dan kering, penggunaan sinar bergelombang pendek seperti sinar x, sinar α , dan sinar UV untuk bahan yang tidak aktif akan berubah akibat temperatur tinggi atau tekanan tinggi. Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin dan sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi mengalami perubahan atau penguraian (Darmandi 2008).

F. *Staphylococcus aureus*

1. Sistematika *Staphylococcus aureus*

Menurut G.M. Garrity, *et al* (2007) sistematika ilmiah dari bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut :

Kingdom : Bakteria
Filum : Firmicutes
Class : Bacili
Ordo : Bacillales
Famili : Staphylococcaceae
Genus : Staphylococcus
Species : *Staphylococcus aureus*

2. Morfologi dan Identifikasi

S. aureus adalah bakteri berbentuk bulat dengan diameter kira-kira 0,7-1,2 μm , dan biasanya hidup bergerombol seperti buah anggur. *S. aureus* tidak bergerak karena tidak mempunyai flagella dan tidak membentuk spora. *S. aureus* mudah tumbuh dalam keadaan aerobik maupun aerob fakultatif pada suhu optimum 37°C. Koloni pada medium padat berbentuk bulat, halus, menonjol dan berkilauan, *S. aureus* membentuk pigmen berwarna kuning emas. *S. aureus* merupakan penyebab infeksi piogenik (menghasilkan pus) pada manusia. *S. aureus* dapat menyebabkan sepsis pada luka bedah, abses payudara, mata lengket, dan lesi-lesi kulit pada bayi (Jawetz *et al* 2005).

S. aureus dapat meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi, tetapi katalase dihasilkan secara tetap. *S. aureus* relatif resisten terhadap pengeringan dan terhadap panas (tahan pada suhu 50°C selama 30 menit). Banyak galur strain resisten terhadap penisilin karena membentuk penisilinase (beta-laktamase), suatu enzim yang merusak penisilin dengan memecahkan cincin beta-laktam. Pembentukannya diatur oleh plasmid yang dapat dipindahkan oleh bakteriofage melalui mekanisme transduksi. Plasmid juga membawa kontrol genetik resistensi terhadap antibiotika lainnya, misalnya tetrasiklin dan eritromisin (Jawetz *et al* 2005).

S. aureus bersifat koagulase positif, yang membedakannya dari spesies yang lain. Protein yang menyerupai enzim yang membekukan plasma beroksalat atau bersitrat. *S. aureus* biasanya membentuk koloni berwarna abu-abu hingga kuning emas pekat. *S. aureus* tumbuh dengan mudah pada sebagian besar media bakteriologis dengan kondisi aerob atau mikroaerofilik, tumbuh paling cepat pada 37°C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada temperatur ruang (20-25°C). Koloni pada media padat berbentuk bulat, halus, timbul, dan mengkilat (Jawetz *et al* 2012).

3. Patogenesis

S. aureus merupakan penyebab infeksi yang bersifat piogenik. Bakteri ini masuk ke dalam tubuh melalui folikel rambut, kelenjar keringat atau luka-luka kecil. *S. aureus* mempunyai sifat dapat menghemolisa darah, menghasilkan koagulasi, membentuk pigmen berwarna kuning emas, dan dapat memecah manitol menjadi asam. Infeksi yang ditimbulkan oleh *S. aureus* dapat meluas ke jaringan sekitarnya melalui darah dan limfe. Perananan yang bersifat menahun dan timbul radang yang disebut osteomielitis. Perluasan lain juga dapat sampai ke paru-paru, selaput otak dan sebagainya (Suryono 2007).

Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses nanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, plebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, dan

endokarditis. *S. aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik (Ryan *et al* 1994, Warsa 1994).

Kontaminasi langsung *S. aureus* pada luka terbuka (seperti luka paska bedah) atau infeksi setelah trauma (seperti osteomyelitis kronis setelah fraktur terbuka) dan meningitis setelah fraktur tengkorak, merupakan penyebab infeksi nosokomial (Jawetz *et al* 2012).

4. Methicillin Resistant Staphylococcus aureus

MRSA adalah golongan bakteri gram positif dalam kasus ini *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik penisilin semisintetis. MRSA dianggap sebagai salah satu organisme utama penyebab infeksi nosokomial sejak dilaporkan pada tahun 1961. Infeksi oleh MRSA diasosiasikan dengan peningkatan morbiditas, kebutuhan akan terapi antibiotik yang lebih lama, biaya rumah sakit yang lebih mahal, rawat inap yang lebih lama, dan peningkatan risiko kematian. Risiko ini meningkat lebih besar pada pasien yang telah diterapi kurang optimal, baik dengan terapi antibiotik yang tidak efektif maupun dengan intervensi bedah yang inadkuat (Lowy 2003).

G. Aktivitas Antibakteri

1. Antibakteri

Antibakteri adalah suatu zat atau senyawa yang dapat menekan atau membunuh pertumbuhan atau reproduksi bakteri. Senyawa atau zat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia, harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya senyawa tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap bakteri tetapi relatif tidak toksik untuk hospes.

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai zat bakteriostatik dan ada yang bersifat membunuh bakteri yang dikenal sebagai zat bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Ganiswarna 2007).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme kerja senyawa antibakteri dibagi menjadi 5 yaitu :

Pertama, mengganggu metabolisme mikroba. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri harus mensintesis sendiri asam folat dari *Para Amino Benzoic Acid* (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antimikroba bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, sehingga terbentuk analog asam folat non fungsional menyebabkan kebutuhan asam folat tidak terpenuhi dan bisa menyebabkan bakteri mati (Ganiswarna 2005). Contoh antibakteri yang bekerja menghambat metabolisme sel bakteri adalah sulfonamida dan trimetoprim (Bakung 2014).

Kedua, menghambat sintesis dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat rusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubah setelah terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Ganiswarna 2005). Contoh antibakteri golongan ini antara lain yaitu penisilin, sefalosporin, vankomisin, dan basitrasin (Radji 2002).

Ketiga, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri. Membran sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Ganiswarna 2005). Contohnya adalah polimiksin, nistatin, golongan makrolida dan poliena (misal amfoterisin B) (Radji 2002).

Keempat, menghambat sintesis protein sel bakteri, bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein sehingga dihasilkan protein yang abnormal dan non fungsional bagi sel mikroba. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini yaitu aktinomisin, rifampisin, streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, dan gentamisin (Radji 2002).

Kelima, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri. Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya bersifat toksik kurang selektif, karena antibakteri ini bersifat sitotoksik yang masih dapat diterima sebagai antibakteri (Ganiswarna 2005). Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini antara lain asam nalidiksat dan golongan kuinolon (Radji 2002).

3. Mekanisme resistensi

Resistensi sel mikroba adalah suatu sifat tidak terganggunya sel mikroba oleh antimikroba. Ada empat tipe mekanisme resistensi suatu mikroorganisme terhadap antibiotik.

Pertama, *natural resistance* (resistensi alamiah). Resistensi jenis ini disebabkan oleh karakteristik struktural bakteri dan tidak terkait dengan penggunaan antibiotik. Hal ini berkembang sebagai akibat dari resistensi alami, atau mikroorganisme tidak termasuk dalam sasaran antibiotik, atau antibiotik tidak mencapai target karena karakteristiknya. Sebagai contohnya, pemberian vankomisin pada bakteri Gram negatif, hasilnya vankomisin tidak dapat melewati membran sel bakteri sehingga bakteri Gram negatif resisten terhadap vankomisin.

Kedua, *acquired resistance* (resistensi yang diperoleh). Resistensi ini merupakan resistensi yang diperoleh sebagai akibat dari perubahan karakteristik genetik dari bakteri. Resistensi ini terjadi akibat tidak berpengaruhnya antibiotik yang sebelumnya masih responsif. Resistensi ini terutama terjadi karena struktur kromosomal atau ekstrakromosomal (plasmid, transposon, dll). Resistensi kromosomal timbul dari mutasi spontan kromosom bakteri. Mutasi tersebut dapat terjadi karena faktor kimia dan faktor fisika. Hal ini dapat menyebabkan perubahan struktur sel bakteri, sehingga dapat menyebabkan menurunnya permeabilitas obat atau mengubah target obat pada sel.

Resistensi ekstrakromosomal adalah resistensi yang tergantung pada elemen genetik ekstrakromosomal yang dapat ditransfer melalui berbagai cara seperti plasmid. Plasmid adalah ekstrakromosomal fragmen DNA yang dapat mereplikasi secara independen dari kromosom. Gen plasmid biasanya bertanggung jawab mengontrol pembentukan enzim yang mampu merusak antimikroba. Kelompok plasmid yang membawa gen resistensi disebut faktor R.

Faktor R dipindahkan dari bakteri satu ke bakteri lain dengan tiga cara yaitu transfermasi, transduksi, dan konjugasi.

Ketiga, Resistensi silang. Resistensi silang adalah keadaan resistensi terhadap antimikroba tertentu yang juga memperlihatkan sifat resistensi terhadap antimikroba lain. Biasanya terjadi antara antimikroba yang memiliki struktur kimia yang hampir sama (derivat tetrasiklin) atau antara antimikroba dengan struktur kimia yang berbeda dengan mekanisme aksi yang hampir sama.

Keempat, *Multi-drug* resisten dan *pan* resisten. Organisme *multi-drug* resisten biasanya adalah bakteri yang menjadi resisten terhadap antibiotik yang dipakai untuk mengobatinya. Ini berarti obat tertentu tidak lagi mampu membunuh atau menghambat bakteri. Resistensi *multi-drug* pada bakteri dapat terjadi dengan dua mekanisme. Pertama, bakteri mengakumulasi beberapa gen, masing-masing mengkode resistensi terhadap obat tunggal. Kedua, resistensi terjadi karena peningkatan ekspresi pengkodean gen. Jika strain bakteri mengalami resisten terhadap tiga atau lebih antibiotik ini dianggap sebagai *multi-drug* resisten. Jika strain hanya peka terhadap satu atau dua antibiotik saja maka dianggap sebagai ekstensif *drug* resisten. Jika strain mengalami resisten terhadap semua golongan antibiotik maka dianggap sebagai *pan* resisten (Cesur and Demiroz 2013).

Staphylococcus aureus memiliki struktur yang disebut dengan *genomic island*. Struktur ini merupakan struktur kontinyu yang beragam dalam ukuran mulai dari 15 kb sampai 70 kb dan dapat menghasilkan berbagai gen virulensi dan resistensi. *S. Aureus* seringkali mengandung DNA heterolog yang mengindikasikan akuisisi eksogen. Struktur ini membantu dalam integrasi kromosom bakteri. Salah satu *genomic island* yang berperan dalam membantu menumbuhkan resistensi *S. aureus* terhadap berbagai antibiotik adalah *resistance island Staphylococcal chromosom casatte mec* atau *SCCmec*. *MecA* mengkode *Penicillin Binding Protein* (PBP) tertentu, disebut dengan PBP2a yang memiliki afinitas rendah terhadap metisilin dan berbagai jenis antibiotik betalaktam lain. PBP2a menyebabkan resistensi intrinsik terhadap betalaktam (Lowy 2003).

4. Resistensi terhadap betalaktam

S. aureus berubah menjadi galur resisten metisilin (MRSA) karena mendapat sisipan suatu elemen DNA berukuran besar antara 20-100 kb yang disebut *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). SCC*mec* selalu mengandung *mecA* yaitu gen yang menyandi PBP2a yang mendasari resistensi MRSA. Resistensi MRSA terhadap metisilin dan terhadap semua antimikroba golongan betalaktam disebabkan perubahan pada protein binding penicillin (PBP) yang normal yaitu PBP2 menjadi PBP2a. PBP2a memiliki afinitas yang sangat rendah terhadap betalaktam sehingga sekalipun bakteri ini dibiakan pada medium mengandung konsentrasi tinggi betalaktam, MRSA tetap dapat hidup dan mensintesa dinding sel (tumbuh). Eksplorasi pada struktur PBP2a menunjukkan adanya perubahan pada situs pengikatan (binding site) yang mengakibatkan rendahnya afinitas. PBP2a disandi oleh gen *mecA* yang merupakan bagian SCC*mec* (Memmi *et al* 2008).

Protein binding penicillin adalah sekelompok protein yang terlibat dalam biosintesa peptidoglikan yaitu mengkatalisa reaksi transpeptidasi (pembentukan anyaman peptida). Peptidoglikan *Staphylococcus* memiliki ciri khas berukuran panjang, berupa struktur anyaman (cross linkage) dengan rantai samping pentaglisin yang fleksibel. Peptidoglikan ini menjadi target antimikroba betalaktam. Resistensi terjadi karena produksi enzim betalaktamase seperti pada galur *S. aureus producing betalactamases* dan perubahan pada struktur PBP seperti yang terjadi pada MRSA. PBP 1, 2 dan 3 memiliki aktifitas transpeptidase primer sedangkan PBP 4 memiliki aktifitas transpeptidase sekunder. Reaksi lain dalam pembentukan peptidoglikan adalah transglikosilasi yang tidak berhubungan dengan *penicillin binding activity* (tidak berhubungan dengan reseptor penisilin). PBP2 memiliki aktifitas unik yaitu selain sebagai enzim transpeptidase ternyata juga memiliki aktifitas transglikosilase. Afinitas PBP2a yang sangat rendah terhadap betalaktam mengakibatkan antimikroba ini tidak dapat mempengaruhi reaksi transpeptidasi. Selain itu karena aktifitas transglikosilasi PBP2a sama sekali tidak terpengaruh oleh betalaktam maka diduga resistensi MRSA juga ditentukan oleh keutuhan fungsi transglikosilasi dari PBP2a ini (Memmi *et al* 2008).

Ekspresi gen *mecA* dikendalikan oleh gen regulator *mecR1* dan *mecI*. Pada keadaan tidak terinduksi/tidak ada induser maka *mecI* akan menekan transkripsi *mecA* dan *mecR1-mecI* (*mec complex*), sebaliknya bila ada induser atau terinduksi maka akan terjadi transkripsi pada *mec complex*. Sejauh ini baru metisilin dan antimikroba betalaktam lainnya yang diketahui merupakan induser. Selain oleh induser, induksi *mecI* juga dapat terjadi karena autokatalitik oleh protease pada membran sel dan mutasi pada kromosom yang belum diketahui secara persis. Autokatalitik pada regulator penisilinase *blaI* juga diperkirakan dapat mengaktifkan *mecA*, karena sekuen *blaI* dengan *mecI* memiliki homologi yang tinggi (Horne *et al* 2009).

Secara fenotipik resistensi MRSA bersifat heterogen artinya dalam satu biakan, nilai MIC sangat bervariasi tergantung tipe *SCCmec* yang dikandungnya. Ekspresi resistensi MRSA juga dipengaruhi konsentrasi paparan betalaktam. Pada kondisi terdapat betalaktam maka nilai MIC akan mendekati nilai sensitif. Syarat mutlak resistensi MRSA adalah adanya PBP2a meskipun dalam jumlah minimal, tetapi ternyata peningkatan produksi PBP2a tidak berkorelasi dengan homogenitas resistensi. Sepasang galur MRSA dengan *mecA* yang sama dan produksi PBP2a yang juga sama tinggi ternyata menghasilkan ekspresi resistensi yang berbeda. Faktor genetik lain seperti gen betalaktamase dan faktor eksternal seperti temperatur, osmolaritas, kandungan ion, tekanan oksigen dan cahaya juga mempengaruhi ekspresi resistensi (Horne *et al* 2009).

H. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri suatu zat digunakan untuk mengetahui apakah zat tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji. Aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu:

Pertama, metode difusi. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan cakram (*disk*) kertas saring, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan sumuran atau silinder, dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Metode cakram kertas saring berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, mediumsebelum

digunakan diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi agar dipengaruhi oleh faktor fisika kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz *et al* 2001).

Kedua, metode dilusi. Metode ini dilakukan dengan mencampur secara homogen suatu obat dalam media dengan jumlah atau konsentrasi yang berbeda-beda, masing-masing media ditambahkan suspensi kuman kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih (Bonang dan Koeswoyo 1982). Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan terhadap bakteri uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al* 2005).

I. Vankomisin

Vankomisin merupakan glikoprotein kecil (Mol Wt ~ 1,450) turunan dari *tricyclic glycosylated nonribosomal peptide* yang dihasilkan dari fermentasi *Actinobacteria* spesies *Amycolatopsis orientalis*. Vankomisin aktif terhadap sebagian besar kuman gram positif termasuk spesies *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Clostridia*, *Listeria*, dan *Bacillus* (Anaizi 2002).

Vankomisin membunuh bakteri dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri. Penghambatan sintesis dinding sel bakteri ini dilakukan melalui proses inhibisi penggabungan subunit *N-acetylmuramic acid* (NAM) dengan *N-acetylglucosamine* (NAG) dalam membentuk matrix peptidoglikan. Peptidoglikan ini adalah komponen utama pembentuk struktur dinding sel bakteri gram positif. Hal ini juga mengakibatkan kerusakan membran sel bakteri dan mengganggu sintesis RNA bakteri (Anaizi 2002).

Indikasi utama vankomisin ialah septicemia dan endocarditis yang disebabkan oleh *Staphylococcus*, *Streptococcus*, atau *Enterococcus* bila pasien alergi terhadap penisilin atau sefalosforin. Vankomisin merupakan obat terpilih

untuk infeksi oleh kuman MRSA dan *colitis* oleh *Clostridium difficile* akibat penggunaan antibiotik (Goodman 2010).

Obat ini sangat toksin sehingga hanya digunakan bila pasien alergi terhadap obat lain yang lebih aman. Ketulian permanen dan uremia yang fatal dapat terjadi pada pemberian dosis besar, terapi yang lama, atau bila diberikan pada pasien gangguan ginjal. Tromboflebitis dan nyeri lokal yang hebat dapat terjadi pada pemberian IV yang lama. Efek samping lain yang mungkin terjadi antara lain shock anafilaksis, toksis epidermal nekrolisis, eritema multiforme, trombositopeni, neutropenia, leukopenia, tinnitus, pening. Vankomisin juga dapat menstimulasi pembentukan *platelet-reactive antibodies* pada tubuh pasien sehingga terjadi trombositopenia, *pethecie*, *hemorrhage*, *ecchymoses*, dan *wet purpura* (Goodman 2010).

J. Landasan Teori

Penyakit infeksi yang banyak diderita masyarakat adalah infeksi kulit yang disebabkan *S. aureus* (Oktalia 2009). *S. aureus* merupakan flora normal pada kulit atau daerah saluran pernafasan bagian atas dan penyebab infeksi piogenik (menghasilkan pus) pada manusia (Jawetz *et al* 2005). *S. aureus* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan infeksi dengan tanda-tanda khas seperti nekrosis dan pembentukan abses. *S. aureus* telah berkembang menjadi MRSA, yaitu *S. aureus* yang resisten terhadap antibakteri golongan penisilin dan beberapa golongan lain. Tingginya angka kejadian MRSA mendorong peneliti untuk mencari obat baru yang lebih efektif dan aman salah satunya dengan menggunakan bahan alam. Salah satu bahan alam yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri adalah daun belimbing wuluh. Penelitian sebelumnya belimbing wuluh terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Senyawa yang diduga memiliki aktivitas antibakteri yaitu flavonoid yang dapat mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki kembali atau *irreversible* (Prayudhani *et al* 2012). Saponin memiliki kemampuan dalam merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding

sel rusak atau hancur (Ayuningtyas 2008). Ajizah (2007) menyatakan bahwa tanin dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim.

Metode yang digunakan untuk memperoleh ekstrak daun belimbing wuluh dalam penelitian ini adalah maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, karena pada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa etanol 70% memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan pelarut air dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* (Pendit *et al* 2016). Aktivitas antibakteri dari ekstrak daun belimbing wuluh diketahui dengan menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan untuk mengetahui nilai zona hambat dari ekstrak. Sedangkan metode dilusi dilakukan dengan cara membuat suatu seri konsentrasi yang terdiri dari beberapa tabung reaksi, masing-masing tabung ditambahkan bahan uji yang akan diperiksa kecuali tabung untuk kontrol positif, kemudian ditambahkan suspensi bakteri yang telah disamakan kekeruhannya dengan 0,5 Mc Farland ke dalam tiap-tiap tabung reaksi kecuali untuk kontrol negatif, hasil yang didapat di metode ini adalah nilai KHM dan KBM (Bonang dan Koeswoyo 1982). Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1% dan sebagai kontrol positif adalah antibiotik vankomisin.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak air dan ekstrak kloroform daun belimbing wuluh terhadap bakteri *S. aureus*. Pada konsentrasi 100 mg mL⁻¹ ekstrak air daun belimbing wuluh menunjukkan diameter zona hambat sebesar 8 mm, sedangkan pada ekstrak kloroform dengan konsentrasi 2 mg/disk menunjukkan adanya zona hambat sebesar 11 mm (Zakaria *et al* 2007).

K. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah

Pertama, ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap MRSA.

Kedua, KHM dari hasil ekstrak etanol 70% daun belimbing wuluh dengan konsentrasi ekstrak yang berbeda-beda dalam membunuh MRSA ditentukan dari hasil penelitian.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh yang diambil dari daerah Sukoharjo Kabupaten Sukoharjo, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah suatu bagian dari populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan kriteria tertentu, sehingga memenuhi syarat random dan representatif. Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh yang diambil secara acak berwarna hijau, segar dan tidak rusak. Tanaman ini diperoleh dari daerah Sukoharjo- Jawa Tengah, yang diambil pada bulan Januari 2017.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah ekstrak daun belimbing wuluh hasil maserasi dengan pelarut etanol 70% yang diuji daya antibakterinya terhadap kultur bakteri MRSA.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah dosis ekstrak daun belimbing wuluh.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah metode ekstraksi, penyimpanan isolat bakteri, laboratorium, peneliti,

sterilitas, medium, peralatan, kemurnian bakteri, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminan.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari ekstrak daun belimbing wuluh dengan dosis yang berbeda-beda terhadap bakteri MRSA.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun belimbing wuluh adalah seluruh daun pada tanaman belimbing wuluh berwarna hijau yang diperoleh dari daerah Sukoharjo Jawa Tengah.

Kedua, serbuk adalah simplisia kering daun belimbing wuluh yang dihaluskan dengan penggiling dan diayak dengan pengayak ukuran mesh 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun belimbing wuluh adalah cairan hasil penarikan sari dari daun belimbing wuluh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian diuapkan dengan *Vacum Rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan penguapan menggunakan *waterbath* untuk mendapat ekstrak kental.

Keempat, bakteri yang dipakai adalah isolat MRSA. Isolat MRSA diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Kelima, cakram antibiotik vankomisin adalah *disc* antibiotik yang mengandung agensia kimia vankomisin dengan dosis 30 µg yang didapat dari laboratorium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Keenam, cakram steril yang belum mengandung agensia kimia yang nantinya akan ditetesi dengan ekstrak belimbing wuluh.

Ketujuh, metode difusi adalah metode uji yang dilakukan untuk mengetahui kepekaan bakteri MRSA terhadap antibiotik vankomisin menggunakan metode difusi dengan medium MHA, dengan cara mengukur diameter hambat kemudian dibandingkan dengan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer*.

Kedelapan, metode dilusi adalah metode uji aktivitas antibakteri dengan membuat satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 60%; 30%;

15%; 7,5%; 3,75%; 1,88%; 0,94%; 0,47%. Kontrol positif berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan bakteri uji, kontrol negatif berisi ekstrak yang paling efektif menghambat pertumbuhan MRSA.

Kesembilan, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari suatu antimikroba yang akan menghambat pertumbuhan mikroorganismenya.

Kesepuluh, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terkecil yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah diinokulasi pada media.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat untuk membuat simplisia yaitu pisau untuk merajang, oven dengan suhu rendah dan konstan, mesin penggiling dan ayakan nomor 40. Alat penyari yang digunakan adalah seperangkat alat maserasi, *Vacum Rotary evaporator*, *waterbath*, bejana maserasi, kain flannel, neraca elektrik, pipet, tabung reaksi, beker gelas.

Alat yang digunakan kultur bakteri adalah cawan petri steril, jarum ose, rak tabung reaksi, inkas, lampu spiritus, korek api, tabung reaksi, kapas lidi steril, botol penampung steril, vortex, objek glass, mikroskop binokuler, pipet volume, penggaris, mikropipet, beker glass, labu takar, gelas ukur.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun belimbing wuluh, bakteri MRSA. Medium yang digunakan adalah *Muller Hinton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Media Blood Agar*

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70% sebagai larutan penyari, sitrat, etil asetat, air, aquadestillata, DMSO 1%, 0,5 *Mc Farland*, kalium tellurit, cat kristal violet, larutan lugol, iodin, aseton, safranin, hydrogen peroksida, cakram antibiotik vankomosin, cakram

antibiotik oksasilin, cakram antibiotik sefoksitin, cakram steril, sabun cair, spiritus, amil alkohol, HCl, CH₃COOH, H₂SO₄.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun belimbing wuluh

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman berkaitan dengan ciri-ciri mikroskopis, makroskopis, dan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman terhadap pustaka yang dilakukan di laboratorium biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun belimbing wuluh dilakukan pada daun yang berwarna hijau, yang diambil di daerah Sukoharjo Jawa Tengah. Daun kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran yang menempel, lalu ditiriskan dan kemudian dikeringkan dengan oven.

3. Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh

Daun yang telah dipilih kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran yang menempel, lalu ditiriskan dan kemudian dikeringkan menggunakan bantuan matahari tanpa terpapar langsung oleh cahayanya. Pengeringan dilakukan selama kurang lebih 5 hari hingga kering yang bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Simplisia yang telah didapat kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40, setelah itu dilakukan perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah.

4. Kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh

Kadar lembab daun belimbing wuluh dilakukan dengan cara serbuk belimbing wuluh ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian diukur kadar lembab dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Suhu yang digunakan adalah 105°C. Penandaan hasil analisa setelah selesai yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang

dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali. Kadar lembab memenuhi syarat dimana suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%.

5. Pembuatan ekstrak etanol

Ekstraksi serbuk daun belimbing wuluh dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk daun belimbing wuluh ditimbang 1000 gram lalu dimasukkan ke dalam bejana kemudian ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 10:75. Campuran tersebut didiamkan selama 5 hari dengan sesekali diaduk hingga merata. Filtrat dengan ampas dipisahkan dengan menggunakan kain flanel. Filtrat yang didapat kemudian dipekatkan dengan *Vacuum Rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan di uapkan dengan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental daun belimbing wuluh (Depkes 2000).

6. Tes bebas etanol daun belimbing wuluh

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat pekat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung didalam daun. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid.

7.1 Identifikasi flavonoid, sebanyak 2 mg ekstrak daun belimbing wuluh ditambahkan 5 mL aquadest selama satu menit, disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah 0,1 gram serbuk Mg, 2 mL larutan alkohol 70% : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning, jingga, pada amil alkohol (Robinson 1995).

7.2 Identifikasi saponin, sebanyak 10 mL air panas dalam tabung reaksi didinginkan kemudian ditambahkan sebanyak 0,5 gram ekstrak dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Depkes 2005).

7.3 Identifikasi tanin, ekstrak ditambah 10 mL air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan saring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan B. Sebanyak 5 mL larutan B ditambah pereaksi besi (III) klorida 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman (Robinson 1995).

8. Sterilisasi

Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin, media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung.

9. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji diambil dari biakan murni pada media NA, diambil kurang lebih 2 ose dan dimasukkan pada media NaCl steril atau BHI, kemudian disamakan kekeruhannya dengan *Mc Farland* 0,5 yang setara dengan jumlah koloni $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

10. Identifikasi bakteri uji

10.1 Identifikasi morfologi koloni dengan media VJA. Suspensi bakteri diinokulasi pada media VJA yang sudah ditambahkan kalium tellurit 1% sebanyak 3 tetes dalam cawan petri dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna medium sekitar koloni kuning. Hal ini disebabkan karena *S. aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan adanya indikator fenol red menyebabkan warna medium di sekitar koloni kuning, sedangkan warna hitam pada koloni disebabkan *S. aureus* kalium tellurit menjadi metalik tellurit.

10.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram *S. aureus* menggunakan Gram A (cat Kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodin sebagai mordan), Gram C (etanol : aseton = 1 : 1 sebagai peluntur), Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan gram dilakukan dengan cara dibuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram B, didiamkan kurang lebih 1

menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C dan didiamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian dikeringkan preparat. Bakteri *S. aureus* dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati di bawah mikroskop.

10.3 Identifikasi biokimia. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium nutrient cair ditambah dengan 2 tetes hidrogen peroksida 3%. Penambahan H_2O_2 akan terurai menjadi H_2 dan O_2 hasil dinyatakan positif bila terlihat gelembung udara disekitar koloni, hal ini disebabkan karena *S. aureus* mempunyai enzim katalase (Jawetz *et al* 2007).

Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci yang diberi asam sitrat, diencerkan (1:5) ditambah 1 ose biakan bakteri, diinkubasi pada suhu $37^{\circ}C$. tabung diperiksa dengan melihat pembentukan selama 1-4 jam. Hasilnya positif kuat jika tabung tes dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat padadinding tabung (Jawetz *et al* 2007).

10.4 Uji hemolisis. Uji hemolisis menggunakan suspensi bakteri *S. aureus* ditanam pada media agar darah, dan selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu $37^{\circ}C$. Adanya aktivitas hemolisis ditandai dengan adanya zona hemolisis pada media agar darah. *S. aureus* yang menghasilkan α -hemolisis akan membentuk zona terang di sekitar koloni, yang menghasilkan β -hemolisis akan membentuk zona agak gelap di sekitar koloni, dan yang menghasilkan δ -hemoisis tidak terbentuk zona hemolisis di sekitar koloni. Sementara itu kuman yang memproduksi kombinasi alfa dan beta-hemolisis akan tampak zona gelap dan terang di sekitar koloni.

10.5 Uji sensitivitas MRSA terhadap antibiotik oksasillin, sefoksitin dan vankomisin. Identifikasi bakteri MRSA dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar *Kirby Bauer*. Prinsip dari metode ini adalah penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu zona hambat akan terlihat sebagai

daerah jernih di sekitar cakram kertas yang mengandung zat antibakteri. Metode difusi dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi yang telah dibuat dan ditekan-tekan pada ujung tabung, diratakan pada media MHA sampai rata. Pada media MHA yang telah ditumbuhi bakteri MRSA kemudian diletakkan cakram antibiotik oksasillin, sefoksitin, dan vankomisin, kemudian media didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang agar agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil dapat dilihat dengan adanya area jernih yang menandakan adanya penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba. Zona hambat ditentukan dengan mengukur diameter area jernih kemudian dibandingkan dengan tabel *Interpretive Standart Kirby Bauer*.

11. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh

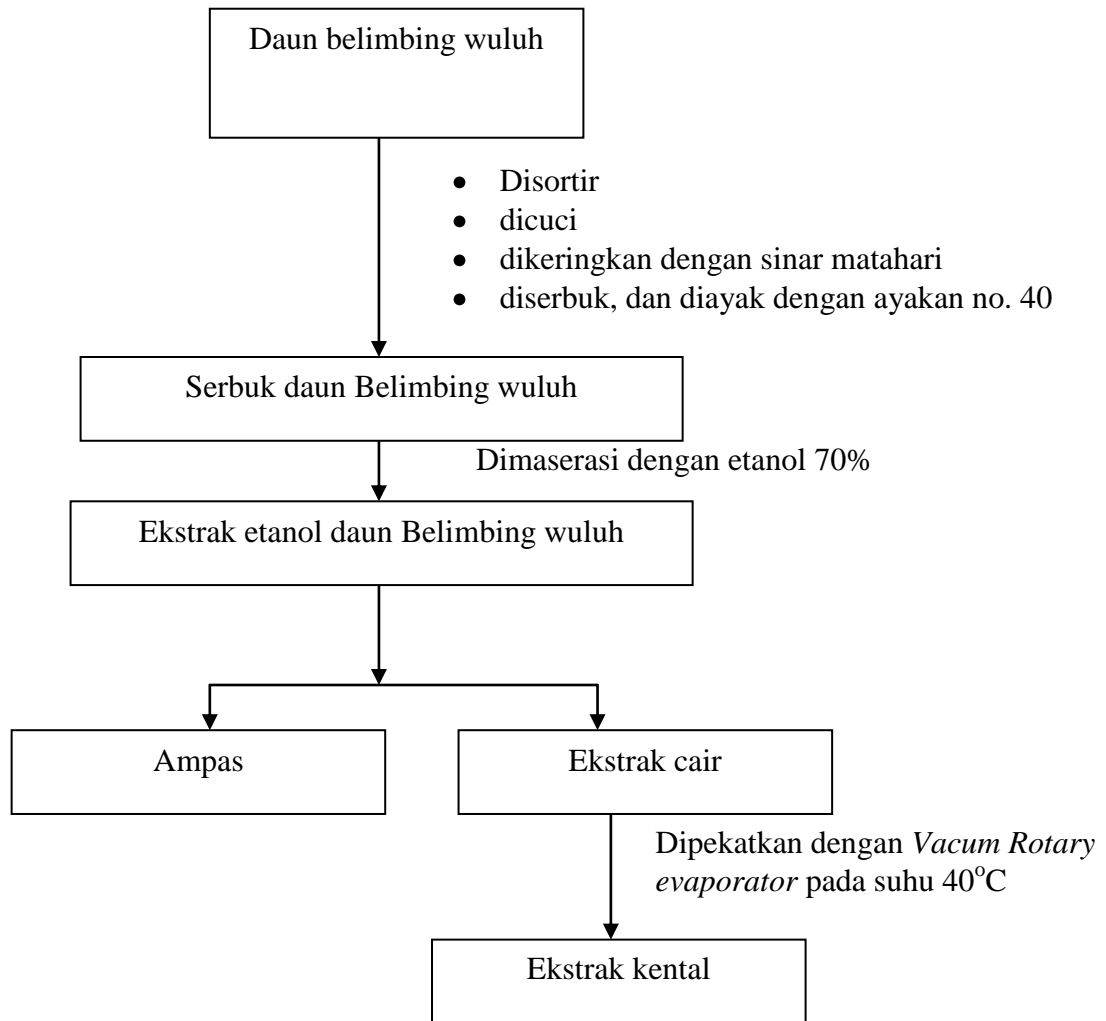
Metode pengujian aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang sudah sesuai dengan *Mc Farland* 0,5 kemudian diratakan pada media MHA, didiamkan pada suhu ruang selama 5-10 menit agar suspensi bakteri terdifusi ke media. Pada media tersebut dibagi menjadi 6 bagian yang sama, kemudian masing-masing diletakkan cakram antibiotik vankomisin 30 µg sebagai kontrol positif, cakram antibiotik oksasillin 1 µg dan cakram sefoksitin 30 µg sebagai kontrol pembanding, cakram steril yang berisi ekstrak daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 40%, 60% dan cakram steril yang berisi DMSO 1% sebagai kontrol negatif. Masing-masing konsentrasi tersebut dilakukan replikasi tiga kali untuk memperoleh data yang akurat. Area jernih disekitar cakram diukur dan hasilnya adalah sebagai diameter zona hambat antibakteri.

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah bahan uji yang dapat membunuh bakteri uji. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung yang terdiri dari 10 tabung reaksi steril. Tabung pertama sebagai kontrol negatif berisi ekstrak dan tabung terakhir sebagai kontrol positif berisi suspensi bakteri. Tabung kedua sampai kesembilan adalah tabung seri pengenceran dengan konsentrasi masing-masing 60%; 30%; 15%; 7,5%; 3,75%; 1,88%; 0,94%; 0,47%. Media BHI dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptis

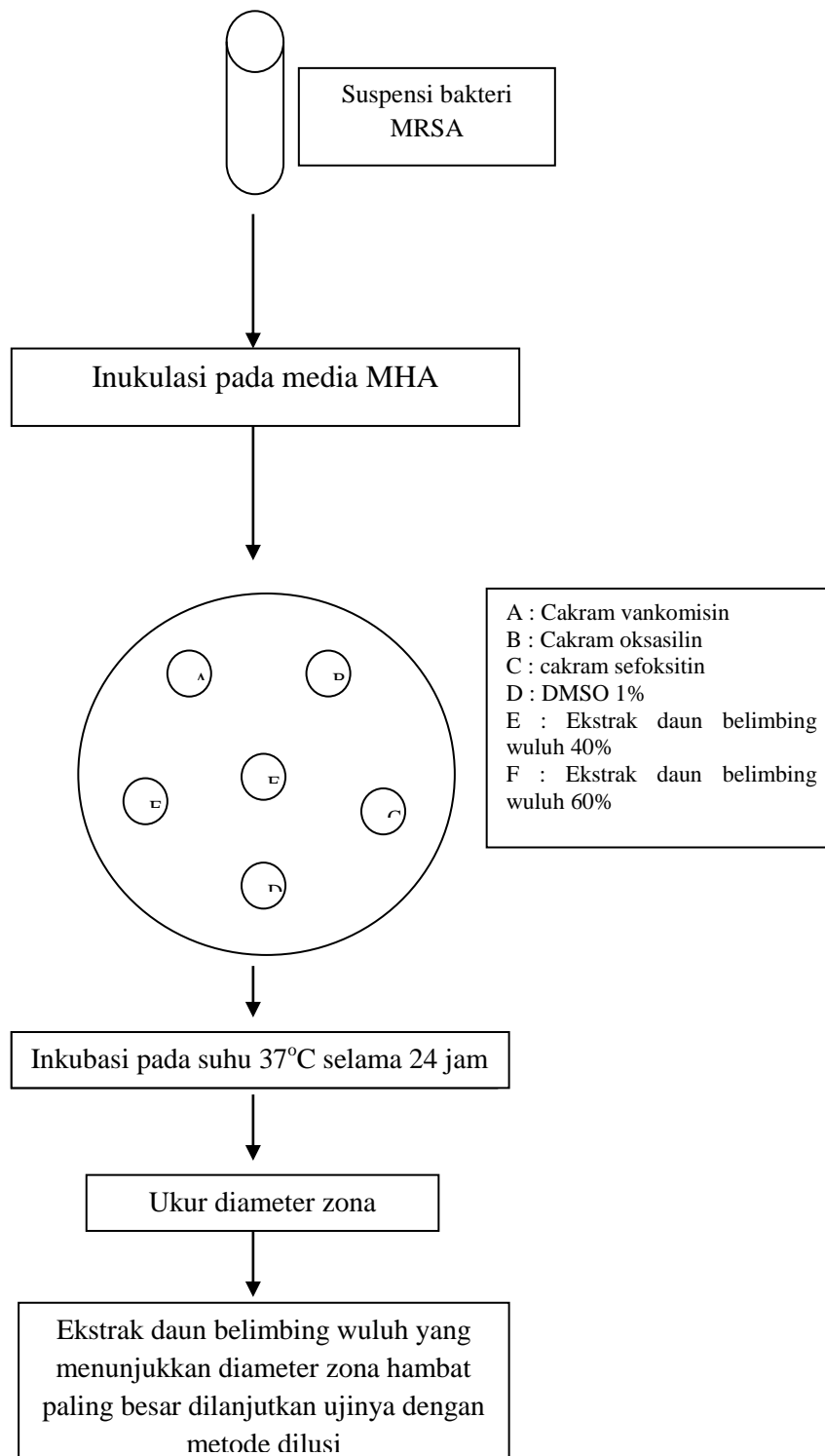
sebanyak 1mL kecuali pada tabung pertama. Selanjutnya pada tabung nomer 2 hingga terakhir diberi suspensi bakteri yang sebelumnya sudah dicocokkan kekeruhannya dengan *Mc Farland* 0,5 sebanyak 0,2mL. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. KBM ditentukan dengan cara seluruh tabung media diinokulasi secara goresan pada media selektif lalu diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 18-24 jam. Mengamati ada atau tidaknya koloni warna hitam dan di sekitar koloni berwarna kuning pada permukaan media VJA.

12. Analisis Hasil

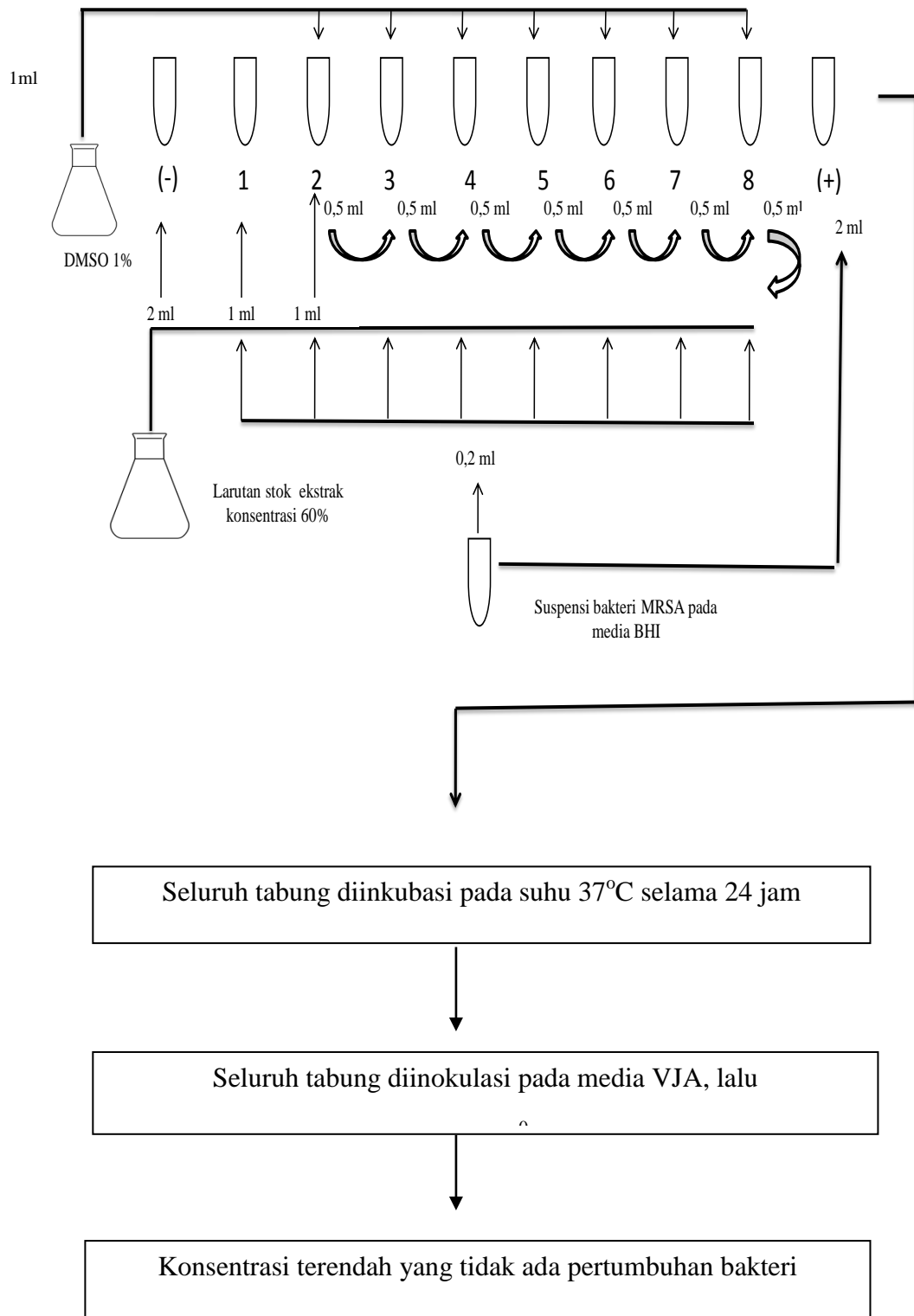
Analisis hasil yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan mengamati kekeruhan pada tabung seri pengenceran, tabung jernih dengan urutan terakhir menunjukkan nilai KHM. KBM ditentukan dengan menginokulasi seluruh tabung dalam cawan petri pada media VJA, kemudian dilihat ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri. Koloni bakteri berwarna hitam dan disekitar koloni berwarna kuning.



Gambar 2. Skema pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh



Gambar 3. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap MRSA dengan metode dilusi

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Identifikasi Tanaman Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Identifikasi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi, Universitas Negeri Sebelas Maret, Surakarta. Identifikasi bertujuan untuk mencocokkan ciri - ciri morfologis simplisia, mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari terjadinya kesalahan dalam pengumpulan bahan serta menghindari tercampurnya bahan dengan simplisia lain (Depkes RI 2000).

Berdasarkan hasil identifikasi yang telah dilakukan diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini benar tanaman belimbing wuluh(*Averrhoa bilimbi* L.). Hasil identifikasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengumpulan bahan dan pengeringan

Daun belimbing wuluh diambil pada waktu sore hari pada saat cuaca cerah. Waktu pemanenan merupakan hal yang penting dalam menentukan kualitas dan kuantitas daun. Dipilih waktu pemanenan sore hari karena tumbuhan telah mengalami proses fotosintesis sempurna, sehingga metabolit yang dihasilkan lebih banyak. Daun dipilih dalam keadaan segar, berwarna hijau dan tidak rusak yang tumbuh di daerah Sukoharjo, Kecamatan Sukoharjo, Surakarta pada bulan Januari 2017. Daun yang telah dipetik disortir kemudian dicuci bersih untuk selanjutnya dilakukan pengeringan. Pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari yang sebelumnya daun ditutupi oleh kain hitam agar tidak terpapar langsung oleh sinar matahari. Sinar ultraviolet pada matahari dapat merusak zat-zat yang terkandung di dalam daun (Pramono 2006). Pengeringan ini bertujuan agar kadar air dalam daun berkurang sehingga mencegah terjadinya pembusukkan oleh jamur atau mikroorganisme lainnya dan mencegah terjadinya perubahan kimia yang berakibat menurunkan mutu simplisia. Pengeringan dilakukan selama 5 hari hingga daun menjadi kering kemudian dilakukan perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh.

Tabel 1. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Persentase % ^(b/b)
7000	1100	15,71

Tabel 1 menunjukkan bahwa daun belimbing wuluh dengan bobot basah 7000 gram dikeringkan dan diperoleh bobot kering sebanyak 1100 gram. Persentase bobot kering terhadap bobot basah sebesar 15,71%. Perhitungan persentase bobot basah terhadap bobot kering dapat dilihat pada lampiran 15.

3. Pembuatan serbuk daun belimbing wuluh

Daun belimbing wuluh yang telah dikeringkan yang kemudian diserbuk menggunakan penggilingan, kemudian diayak dengan ayakan nomor 40. Pengayakan ini bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel serbuk sehingga memperluas permukaannya dan mempermudah tertariknya zat aktif. Ayakan nomor 40 menunjukkan dimana dalam setiap inchi ayakan terdapat 40 lubang persegi dengan ukuran partikel sebesar 422 mikron. Derajat kehalusan serbuk sangat berpengaruh terhadap proses maserasi, karena serbuk yang terlalu halus menyebabkan simplisia tidak dapat terekstraksi dengan sempurna. Serbuk hasil ayakan ini dinamakan serbuk simplisia yang digunakan untuk penyarian. Penyerbukan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan, memperluas permukaan partikel dengan pelarut sehingga proses ekstraksi dapat berlangsung efektif (Parrot 1971).

4. Penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh

Penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh dilakukan di laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi. Sebanyak 2 gram serbuk ditimbang dan diukur kadar lembabnya menggunakan alat *moisture balance* pada suhu 105°C. *Moisture balance* merupakan alat yang digunakan untuk mengukur kadar lembab, prinsip alat ini pada saat kumparan listrik memanaskan berat sampel secara otomatis dimonitor dan persentase kadar air dihitung, ketika persentase yang termonitor mencapai kestabilan maka alat akan memberikan tanda dan kadar air sampel ditampilkan. Kelebihan dari alat ini tidak memakan waktu lama, hasil yang ditampilkan tepat, mudah untuk dioperasikan, mengurangi *human error* pada saat penimbangan (Kumalasari 2012). Dalam penentuan kadar lembab ini

dilakukan tiga kali pengulangan untuk memperoleh nilai rata-rata kadar lembab dari serbuk. Kadar lembab tidak boleh lebih dari 10%, karena kadar lembab yang tinggi dalam simplisia dapat mengaktifkan enzim-enzim dalam simplisia yang dapat berakibat rusak atau berubahnya komposisi kimia sehingga akan menurunkan kualitas simplisia tersebut (Voight 1994). Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh

No	Bobot awal (gram)	Kadar lembab serbuk %	Waktu (detik)
1	2	8,3	490
2	2	8,5	493
3	2	8,3	491
Rata-rata		8,3	

Berdasarkan tabel 2 rata-rata kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh sebesar 8,3% dengan nilai SD 0,11547. Kadar lembab tersebut telah dapat mengurangi proses enzimatik sehingga proses pembusukan semakin lambat.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Metode pembuatan ekstrak pada penelitian ini dengan menggunakan cara maserasi karena pengerjaan dan peralatannya sederhana. Selain itu, cara maserasi lebih menguntungkan untuk senyawa yang tidak tahan panas, metode ini tidak menyebabkan terjadinya degradasi dari senyawa (Depkes 2000). Cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, kurkumin antrakinon, flavonoid, steroid, dan klorofil (Depkes 1986), etanol juga dapat menghambat kerja enzim sehingga terhindar dari proses hidrolisis dan oksidasi (Voight 1994)

Sebanyak 1000 gram serbuk dari daun belimbing wuluh yang dilarutkan dengan total pelarut sebanyak 10 L, diperoleh filtrat sebanyak 8,5 L. Bobot ekstrak kental yang diperoleh dari hasil maserasi adalah sebanyak 137,65 gram ekstrak. Data hasil pembuatan ekstrak etanol daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pembuatan ekstrak maserasi daun belimbing wuluh

Bahan sampel	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen ekstrak (b/b%)
1000	137,65	13,77

Berdasarkan tabel 3 persentase rendemen ekstrak maserasi daun belimbing wuluh yang diperoleh sebanyak 13,77%. Rendemen ditentukan untuk mengetahui prosentase senyawa yang tertarik pada waktu proses ekstraksi. Berdasarkan hasil di atas menunjukkan ekstrak telah memenuhi standar sebagai ekstrak kental dengan presentase rendemen antara 5-30%. Organoleptis ekstrak warna coklat tua, bentuk kental. Hasil perhitungan ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 15.

6. Tes bebas etanol ekstrak maserasi daun belimbing wuluh

Ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan tes bebas etanol dengan melakukan uji esterifikasi alkohol. Prinsip dari uji ini adalah suatu asam karboksilat yang direaksikan dengan senyawa alkohol dalam suasana asam, akan menghasilkan suatu ester dan H₂O yang terpisah. Hasil tes bebas etanol ekstrak daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil tes bebas etanol ekstrak maserasi daun belimbing wuluh

Prosedur	Hasil	Pustaka
Ekstrak + H ₂ SO _{4conc} +CH ₃ COOH, dipanaskan	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol	Tidak tercium bau ester yang khas dari etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi, selain itu etanol sendiri bersifat sebagai antibakteri dan antifungi sehingga dapat menimbulkan positif palsu pada perlakuan sampel. Hasil tes bebas etanol pada tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh tersebut sudah bebas dari pelarutnya etanol 70% yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Ekstrak daun belimbing wuluh selanjutnya diidentifikasi kandungan senyawa kimia yang ada di dalamnya. Hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak etanol daun belimbing wuluh dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun belimbing wuluh secara kualitatif

Senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil
		Ekstrak
Saponin	Reaksi positif bila busa masih terbentuk selama 30 menit setelah penetesan HCl 2 N (Depkes 2005).	+
Tanin	Reaksi positif bila menjadi warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Robinson 1995).	+
Flavonoid	Reaksi positif bila timbul warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson 1995).	+

Keterangan :
 + : ada senyawa
 - : tidak ada senyawa

Pada tabel 5 terlihat ekstrak etanol daun belimbing wuluh menunjukkan hasil positif mengandung senyawa kimia flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh (Pendit *et al* 2016) yang menunjukkan ekstrak etanol daun belimbing wuluh terbukti mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil identifikasi kualitatif kandungan ekstrak etanol daun belimbing wuluh dapat dilihat pada lampiran 10.

8. Identifikasi bakteri uji MRSA

Identifikasi bakteri ini bertujuan untuk mencocokkan ciri-ciri morfologi bakteri sesuai dengan pustaka dan mengetahui kebenaran bakteri yang di uji adalah MRSA. Hasil pengujian yaitu beberapa koloni dengan warna hitam, karena MRSA dapat mereduksi telurit menjadi metalik, warna medium disekitar koloni berwarna kuning karena bakteri dapat memfermentasi mannitol menjadi asam

yang kemudian mengubah indikator phenol red yang terdapat dalam media VJA dari warna merah menjadi warna kuning (Jawetz *et al* 2012).

Hasil pewarnaan Gram dengan perbesaran kuat (100x) tampak koloni berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur. Bakteri Gram positif (MRSA) memiliki dinding sel yang lebih tebal daripada bakteri Gram negatif, sehingga pada pengecatan Gram MRSA dapat mengikat kompleks zat warna kristal ungu-iodin dan dapat mempertahankan warna ungu dari Gram A (Pratita 2012).

Uji katalase penting untuk membedakan *Streptococcus* (katalase negatif) dengan *Staphylococcus* yang menghasilkan enzim katalase (katalase positif). Uji katalase dilakukan dengan menambahkan H₂O₂ 3% ke isolat bakteri kultur yang menunjukkan katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung udara.. karena bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H₂O₂ menjadi H₂ dan O₂. Uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri uji. Enzim ini penting untuk pertumbuhan aerobik karena H₂O₂ yang terbentuk oleh enzim pernafasan bersifat racun terhadap sel mikroba (Jawetz *et al* 2007). MRSA dapat bersifat patogen dan kurang patogen atau non patogen, cara membedakan sifat tersebut dapat melalui uji koagulase. Koagulase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh *S. aureus* yang dapat menggumpalkan plasma dengan bantuan faktor yang terdapat dalam serum. Oleh karena itu peran koagulase yang dihasilkan dapat digunakan sebagai sarana diagnostik (Bruckler *et al* 1994). Prinsip uji ini adalah terjadi atau tidak terjadinya penggumpalan plasma darah (plasma darah kelinci) setelah ditambahkan isolat biakan bakteri. Penggumpalan terjadi pada plasma darah yang ditambahkan isolat bakteri MRSA sehingga uji koagulase positif untuk MRSA. Hasil positif ini menandakan bahwa bakteri MRSA adalah bakteri patogen.

Uji hemolisis pada MRSA dilakukan untuk mengetahui tipe hemolisis pada bakteri. Hemolisin merupakan toksin yang dapat membentuk suatu zona hemolisis di sekitar koloni bakteri. *S. aureus* menghasilkan 4 jenis toksin hemolitik yaitu α -hemolisis, β -hemolisis, γ -hemolisis dan δ -hemolisis (Bruckler *et al* 1994). Pada media agar darah *S. aureus* apabila membentuk zona terang disekitar koloni,

artinya membentuk α -hemolisis, sedangkan zona agak gelap termasuk β -hemolisis dan γ -hemolisis tidak terlihat zona disekitar koloni sedangkan kombinasi antara α -hemolisis dan β -hemolisis akan tampak zona gelap dan terang di sekitar koloni (Skalka *et al* 1979). Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa isolat *S. aureus* yang ditanam pada media agar darah membentuk zona gelap disekitar koloni bakteri atau bersifat β -hemolisis. Hemolisin yang dihasilkan *S.aureus* bersifat toksik karena dapat melisis sel darah merah hospes. Hemolisin merupakan ekspoprotein yang mempunyai aktivitas baik enzimatis maupun toksin (Williams *et al* 2000). Kebanyakan *S. aureus* yang memproduksi hemolisin termasuk bersifat pathogen (Bruckler *et al* 1994).

Tabel 6. Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan koagulase

Jenis uji	Hasil	Keterangan
Uji katalase	Terbentuk gelembung gas	(+)
Uji koagulase	Hasil reaksi terjadi penggumpalan	(+)
Uji hemolisis	Koloni kecil, transparan, berwarna putih	(+)

Keterangan: (+) : positif *Staphylococcus aureus*
 (-) : negatif *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan semua hasil uji dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri MRSA yang diidentifikasi adalah *Staphylococcus aureus*.

9. Uji sensitivitas MRSA dan *S. aureus* terhadap antibiotik

MRSA merupakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah menjadi resisten terhadap antibiotik yang umumnya mampu membunuh *S. aureus* seperti metisilin dan antibiotik golongan beta-laktam seperti penisilin dan oksasilin. MRSA merupakan bakteri yang dapat menimbulkan berbagai infeksi, seperti infeksi pada kulit, tulang, paru, jantung, atau infeksi sistemik, selain itu MRSA merupakan bakteri yang paling sering menjadi penyebab terjadinya infeksi nosokomial. Infeksi ini bisa menyebabkan pasien terkena bermacam-macam penyakit, dan setiap penyakit mempunyai gejala yang berbeda-beda. Beberapa penyakit yang paling sering terjadi akibat infeksi nosokomial adalah infeksi saluran kemih, infeksi aliran darah, pneumonia dan infeksi luka operasi (Wirahjasa 2012). Hingga kini belum ada terapi infeksi MRSA yang benar-benar

efektif, vankomisin yang merupakan *drug of choice* untuk infeksi MRSA ternyata memiliki efek bakterisidal yang lambat, tetapi sampai saat ini glikopeptida vankomisin masih merupakan pilihan terapi utama pada infeksi MRSA.

Glikopeptida vankomisin adalah molekul berukuran besar yang bekerja menghambat tahap akhir sintesa peptidoglikan dan anyamannya. Secara umum diketahui bahwa glikopeptida mencegah reaksi transglikosilasi dan transpeptidasi sehingga terjadi kegagalan sintesa dinding sel. Vankomisin dikatakan peka terhadap *Staphylococcus* bila mampu mematikan pada konsentrasi 4 µg/mL, intermediet antara 8-16 µg/mL, dan resisten pada konsentrasi 32 µg/mL (Yuwono, 2011)

Uji sensitivitas pada bakteri MRSA dilakukan dengan membandingkan diameter zona hambat sesuai dengan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer*. Pada penelitian kali ini antibiotik yang digunakan untuk uji resistensi bakteri MRSA terhadap metisilin adalah oksasilin dan sefoksitin, ini karena metisilin tidak lagi diproduksi di pasaran. Pada beberapa penelitian sebelumnya, seperti yang telah dilakukan oleh (Sudigdoadi 2010) oksasilin dianggap lebih stabil, sensitif terhadap isolat heteroresisten, dan secara komersial tersedia di pasaran dibandingkan dengan metisilin. Sefoksitin merupakan salah satu antibiotik pilihan dalam uji sensitivitas bakteri MRSA terhadap metisilin hal ini dikarenakan secara struktur kimia medisinal antibiotik golongan penisilin dan golongan sefalosporin hampir sama, sehingga dianggap mampu membuktikan sensitivitas bakteri MRSA terhadap metisilin. Berdasarkan beberapa publikasi telah menunjukkan bahwa sefoksitin lebih dapat diandalkan daripada oksasilin.

Tabel 7. Hasil uji sensitivitas MRSA dan *S. aureus* terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, dan vankomisin.

Antibiotik	Diameter zona hambat (mm)	Diameter zona hambat (mm)
	MRSA	<i>S. aureus</i>
Oksasilin	0	35
Sefoksitin	0	25
Vankomisin	25	>15

Dari hasil uji sensitivitas MRSA menunjukkan bahwa antibiotik oksasilin dan sefoksitin tidak memberikan zona hambat terhadap bakteri. berdasarkan tabel

Interpretive Standards Kirby Bauer bakteri dinyatakan resisten terhadap oksasilin jika memiliki zona hambat ≤ 10 mm dan resisten terhadap sefoksitin jika memiliki zona hambat ≤ 21 mm. Berdasarkan hasil tersebut maka diketahui bakteri uji yang digunakan resisten terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin, tetapi masih menunjukkan sensitivitas terhadap antibiotik vankomisin. Hal ini membuktikan bahwa bakteri yang digunakan benar *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

10. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Pengujian aktivitas ekstrak belimbing wuluh terhadap MRSA dilakukan dengan dua metode, yaitu secara difusi dan dilusi. Metode difusi bermanfaat untuk mengetahui zona hambat dari ekstrak yang bersifat bakteristatik, sementara pada metode dilusi dapat digunakan untuk mengetahui dosis minimal dari ekstrak yang bersifat bakteriosidal. Hasil uji dengan metode difusi dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 8. Hasil uji sensitivitas ekstrak daun belimbing wuluh terhadap MRSA dan *S. aureus* secara difusi

Perlakuan	Rata-rata diameter zona hambat (mm)	Rata-rata diameter zona hambat (mm)
	MRSA	<i>S. aureus</i>
Kontrol negatif	0	0
Ekstrak konsentrasi 40%	9,3	12,3
Ekstrak konsentrasi 60%	11	15
Kontrol positif	25	>15
Kontrol pembandingan 1	0	34
Kontrol pembandingan 2	0	25

Keterangan :

Kontrol negatif : DMSO 1%
 Kontrol positif : vankomisin
 Kontrol pembandingan 1 : oksasilin
 Kontrol pembandingan 2 : sefoksitin

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *S. aureus*, dengan tujuan dapat mengetahui besarnya zona hambat yang diberikan oleh ekstrak etanol daun belimbing wuluh. Berdasarkan hasil di atas diketahui terdapat perbedaan zona hambat yang diberikan oleh ekstrak terhadap bakteri MRSA dan *S. aureus*. Konsentrasi ekstrak yang dipilih untuk dilanjutkan pada metode dilusi dalam penelitian ini adalah ekstrak

dengan konsentrasi 60%. Hal ini dikarenakan zona hambat yang muncul pada ekstrak dengan konsentrasi 40% terlalu kecil dan mempunyai *range* yang terlalu dekat dengan zona hambat metisilin yang dianggap resisten, yaitu ≤ 9 mm. Ekstrak etanolik dalam penelitian ini dibuat dalam sediaan suspensi. Sediaan dibuat dalam bentuk suspensi dengan tujuan agar penyebaran zat aktifnya terdispersi dengan sempurna dan homogen.

Kontrol negatif dalam penelitian ini adalah *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO), yang digunakan sebagai pembanding untuk mengetahui adanya pengaruh pembawa terhadap meningkatnya lebar zona hambat terhadap bakteri MRSA. Senyawa pembawa yang digunakan untuk membuat suspensi ekstrak adalah DMSO dengan konsentrasi 1%. Hal ini dikarenakan sifat senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun belimbing wuluh bersifat polar, dan berdasarkan prinsip dasar kelarutan dimana suatu zat hanya akan larut dalam pelarut yang sesuai maka dipilih pelarut yang sesuai yaitu DMSO. Yuliani (2001) telah membuktikan bahwa DMSO tidak aktif sebagai antibakteri, sehingga tidak mengganggu pengamatan uji aktivitas antibakteri. Kontrol positif dalam penelitian ini adalah vankomisin, yang digunakan sebagai pembanding untuk mengetahui perbedaan zona hambat yang diberikan oleh antibiotik vankomisin dan ekstrak etanol daun belimbing wuluh. Antibiotik oksasilin dan sefoksitin dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol pembanding guna membuktikan bahwa bakteri yang dipakai benar MRSA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 40% dan 60% mampu memberikan zona hambat sebesar 9,3 mm dan 11 mm terhadap bakteri MRSA dari tiga kali replikasi, namun zona hambat yang berbeda ditunjukkan oleh ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi yang sama terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Penelitian yang dilakukan terhadap ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 40% dan 60% pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menunjukkan diameter hambat yang terbentuk sebesar 12,3 mm dan 15 mm dari tiga kali replikasi. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh

mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* baik yang telah resisten maupun tidak.

Beberapa senyawa yang terkandung dalam daun belimbing wuluh seperti flavonoid, saponin, dan tanin diketahui mempunyai kemampuan sebagai antibakteri. Senyawa saponin dapat bekerja sebagai bakteriostatik dengan cara merusak membran sitoplasma (Robinson 2005). Senyawa flavonoid berfungsi sebagai bakteriostatik dan mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri dan dapat merusak membran sitoplasma (Pelczar dkk. 1998). Sementara menurut Ajizah (2007) tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel sehingga mengganggu permeabilitas sel. Perbedaan diameter zona hambat pada bakteri *S. aureus* dan MRSA dikarenakan pada MRSA bakteri telah menjadi resisten, penyisipan gen *mecA* pada strain *S. aureus* menyebabkan berubahnya PBP2 menjadi PBP2a yang memiliki afinitas rendah terhadap antibiotik golongan betalaktam. Hal ini menyebabkan permeabilitas membran sel pada bakteri MRSA tidak mudah untuk dirusak, sehingga ekstrak dianggap kurang mampu merusak sintesis dinding sel bakteri karena strain MRSA telah mengalami resistensi. Zona hambat yang terbentuk sebesar 11 mm membuktikan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri yang baik pada MRSA dibandingkan dengan antibiotik sebelumnya seperti metisilin, oksasilin, dan sefoksitin, meskipun aktivitas antibakterinya tidak bisa melebihi *drug of choice* pada terapi karena infeksi MRSA yaitu vankomisin. Aktivitas antibakteri ekstrak ini berpotensi untuk menggantikan antibiotik sebelumnya yang telah resisten.

Hasil uji aktivitas ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA dengan metode dilusi. Konsentrasi ekstrak etanol dari daun belimbing wuluh adalah 60%; 30%; 15% 7,5%; 3,75%; 1,875%; 0,9375%; 0,46875% dengan kontrol positif berupa bakteri uji dalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kontrol negatif berupa ekstrak etanol daun belimbing wuluh. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menunjukkan konsentrasi terendah ekstrak yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji dengan metode dilusi dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA dengan metode dilusi

No	Konsentrasi (%)	Hasil		
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	60	-	-	-
3	30	-	-	-
4	15	-	-	-
5	7,5	+	+	+
6	3,75	+	+	+
7	1,875	+	+	+
8	0,9375	+	+	+
9	0,46875	+	+	+
10	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :
 (-) : tidak ada pertumbuhan bakteri
 (+) : ada pertumbuhan bakteri
 Kontrol negatif : larutan stok (ekstrak)
 Kontrol positif : suspensi bakteri

Hasil penelitian dengan metode dilusi ini seharusnya menunjukkan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA, tetapi pada penelitian kali ini KHM tidak dapat dilihat karena pengaruh warna ekstrak yang pekat (coklat), sehingga tidak dapat diketahui tabung jernih ditunjukkan pada konsentrasi berapa. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) diperoleh dari menginokulasi semua tabung pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) dan diinkubasi selama 24 jam. Hasil inkubasi menunjukkan pada konsentrasi 60%, 30% dan 15% tidak ada pertumbuhan koloni bakteri, sehingga diketahui nilai KBM ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap bakteri MRSA adalah pada konsentrasi 15%. Hal ini berkaitan dengan kandungan senyawa kimia dari ekstrak daun belimbing wuluh yang berbeda dalam setiap seri pengenceran.

Kandungan belimbing wuluh yang diduga sebagai antibakteri adalah flavonoid, saponin, dan tanin. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme antibakteri flavonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkelas atau ikatan hydrogen dengan

menumpuk basa pada asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Dihidroksilasi pada cincin A berperan penting pada aktivitas antibakteri flavonoid. Hal ini menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan lisosom. Kedua, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat fungsi membran sel yaitu dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga dapat merusak membran sel dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Penelitian lain membuktikan flavonoid mengganggu permeabilitas membran sel dan menghambat ikatan enzim ATPase dan fosfolipase. Ketiga, mekanisme antibakteri flavonoid dengan cara menghambat metabolisme energi yaitu dengan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat sitokrom C reduktase sehingga proses metabolisme dan biosintesis makromolekuler terhambat (Cushnie 2005).

Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri lisis, jadi mekanisme kerja saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Cavalieri *et al* 2005).

Tanin yang terdapat pada daun belimbing wuluh juga dapat berikatan dengan dinding sel mikroorganisme dan dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme atau aktivitas enzim. Hal tersebut membuktikan bahwa ekstrak etanol daun belimbing wuluh memang mempunyai aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan kemampuannya dalam membunuh bakteri MRSA.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dengan konsentrasi 60% zona hambat yang dihasilkan sebesar 11 mm.

Kedua, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) tidak dapat dilihat karena pengaruh warna ekstrak yang pekat atau coklat. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) sebagai antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) adalah pada konsentrasi 15%.

B. Saran

Pertama, dari hasil yang telah diperoleh maka disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut terhadap ekstrak daun belimbing wuluh menggunakan metode fraksinasi untuk mengetahui secara spesifik fraksi yang mempunyai aktivitas antibakteri.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut uji aktivitas antibakteri secara *in vivo* terhadap ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung: Grafindo Media Pratama.
- Ajizah A, Thihana, Mirhanuddin. 2007. Potensi Ekstrak Kayu Ulin (*Euksideroxylon zwageri*) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Bioscientiae* 4:37-42.
- Anaizi N. 2002. Vancomycin. *University of Rochester Medical Center* 2:1-4.
- Ansel HC. 2005. *Pengantar untuk Sediaan Farmasi*. Edisi keempat. Ibrahim F, penerjemah. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*. Hlm 40-43.
- Ayuningtyas AK. 2008. Efektivitas Campuran Meniran (*Phyllanthus niruri*) dan Bawang Putih (*Allium sativum*) untuk Mengendalikan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepenus*). [Skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Bakung CT. 2014. Studi Penggunaan Antibiotik pada Pasien ISPA Rawat Jalan di Rumah Sakit Prof. Dr. Aloi Saboe Kota Gorontalo [Tesis]. Gorontalo: Fakultas Farmasi, Universitas Negeri Gorontalo.
- Bonang G, Koeswoyo. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik*. Jakarta: Gramedia.
- Bruckler J, Schwarz S, Untermann F. 1994. *Staphylokokken-Infektionen und – Enterotoxine*. Band. II/1, In Blobel, H. und Schlieer (Eds), *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart.
- Cavalieri SJ *et al.* 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology: USA.
- Cesur S, Demiroz AP. 2013. Antibiotics and The Mechanisms of Resistance to Antibiotic. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences* Vol. 21, No. 4.
- Cushnie TPT, Lamb AJ. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agent* 26: 343-356.
- Darmandi. 2008. *1001 Resep Herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- [DEPKES RI]. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- [DEPKES RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI]. 2005. *Materia Medika Indonesia. Jilid III*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dzen SM, Santoso S, Roekistiningsih, Santosaningsih D. 2005. The Difference of Antibiotics Resistance Pattern Of *Coagulase negative Staphylococci* From Blood Isolate in Dr. Saiful anwar General Hospital in Malang During The Year of 2000-2001 and 2004-2005. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* Vol. 21, No.3.
- Erikawati D, Santosaningsih D, Santoso S. 2016. Tingginya prevalensi MRSA pada Isolat Klinik Periode 2010-2014 di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, Indonesia. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* Vol. 29, No. 2.
- Fardiaz, Srikandi. 2001. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Hlm 190.
- Farouq. 2003. Ekstrak sebagai Salah Satu Pengembangan Bentuk Obat Tradisional. Seminar POKJANAS TOI XXIII. Jakarta: Universitas Pancasila. Hlm 12
- Ganiswarna. 2005. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi IV. Jakarta: Gaya Baru. Hlm 571-575.
- Ganiswarna. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V. Jakarta: Gaya Baru. Hlm 585-598.
- Garrity, GM *et al.* 2007. *Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea*, Release 7.7. Michigan: Michigan State University Board of Trustees. Hlm 362-464.
- Goodman, Gilman. 2010. *Manual Farmakologi dan Terapi*. Brunton LL, Parker KL, editor. Sukandar EY, Adnyana IK, Sigit JI, Sasongko LDN, Anggadiredja K, alih bahasa; Manurung J, Aini N, Hadinata AH, Fazriyah Y, Vidhayanti H, editor edisi bahasa Indonesia. Jakarta: Penerbit buku Kedokteran EGC.
- Gunawan D, Mulyani S. 2004, *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid I*. Jakarta: Penebar Swadaya. Hlm 77-82, 87-92.
- Guntur A. 2007. The Role of Cepevime: Empirical Treatment in Critical Illness. *Jurnal Kedokteran dan Farmasi Dexa Media* Vol. 20, No. 2.
- Horne KC *et al.* 2009. Prospective Comparison of the Clinical Impacts of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus (MRSA) and Vancomycin-Susceptible MRSA. *American Society for Microbiology* Vol. 53. No. 8.

- Inyu. 2006. Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*). <http://inyu.mutiply.com/journal/item/3.23Agustus2008>.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya: Salemba Medika. Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan* Edisi XXIV. Bonang G, penerjemah. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2007. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan* Edisi XXV. Bonang G, penerjemah. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan* Edisi XXVI. Ed. Elferia Nr, Penerjemah. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Kumalasari H. 2012. Validasi Metoda Pengukuran Kadar Air Bubuk Perisa Menggunakan *Moisture Analyzer* Halogen HB43-S sebagai Alternatif Metoda Oven dan Karl Fischer [Tesis]. Bogor: Fakultas Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor.
- Kusuma SA. 2009. *Staphylococcus aureus* [KTI]. Bogor: Fakultas Farmasi. Universitas Padjadjaran.
- Kurnia YN, Afifah A, Mustofa, Firdausy U. 2010. Pengaruh Pemberian Air Rebusan Daun Pare (*Momordica charantia* L) terhadap Kadar Kolesterol Total Serum Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) dengan Induksi Hiperkolesterolemia [PKM]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Sebelas Maret.
- Lathifah QA. 2008. Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri pada Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan Variasi Pelarut [Skripsi] Malang: Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri.
- Lowy FD. 2003. Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation* Vol. 111, No. 9.
- Memmi G *et al.* 2008. *Staphylococcus aureus* PBP4 is Essential for Betalactam Resistance in Community-Acquired Methicillin-Resistant Strains. *American Society for Microbiology* Vol. 52, No. 11.

- Merchant IA, Packer RA. 1961. *Veterinary Bacteriology and Virology*. 6th ed. Iowa: Iowa State University Press. Hlm 193-209.
- Nuria MC, Faizatun A, Sumantri. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha cuircas* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian*. Vol. 5, No. 2. Hlm 10-11.
- Oktalia. 2009. *Kapita Selekta Dispensing I*. Yogyakarta: UGM Press. Hlm 27-56.
- Parrott EL. 1971. *Pharmaceutical Technology Fundamental Pharmaceutics*, 3rd ed. Mineapolis: Burgess Publishing Company.
- Pelczar JM. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid 2. Alih Bahasa: Ratna Ratna Siri Hadiotomo*. Jakarta: UI Press.
- Pendit P, Zubaidah E, Sriherfyna FH. 2016. Karakteristik Fisika-Kimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurnal Pangan dan Agroindustri Universitas Brawijaya* Vol. 4, No. 1.
- Praeparandi. 2006. *Card System Analisia Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung: Seksi Diklat Stenhl.
- Pramono S. 2006. *Penanganan Pasca Panen dan Pengaruhnya terhadap Efek Terapi Obat Alami*. Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXVII. Bogor. 15-18 Sept.2005. Hal 1-6.
- Pratita, Maria Yuli E, Surya Rosa P. 2012. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik dari Sumber Mata Air Panas di Songgoriti Setelah Dua Kali Inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits* Vol. 1, No. 1.
- Prastowo EA. 2013. *Standarisasi Simplisia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Prayudhani MF, Hastuti US, Suarsini E. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Kulit Batang Sawo Kecil (*Manilkara kauki* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli*. [Laporan Penelitian]. Surakarta: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Sebelas Maret.
- Radji M. 2002. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hlm 189-192.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung : Institut Teknologi Bandung. Hlm 77.
- Robinson T. 2005. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung : Institut Teknologi Bandung.

- Ryan KJ *et al.* 1994. *Medical Microbiology an Introduction to Infections Disease* 3rd ed. Connecticut: Appleton and Lange.
- Soenarjono H. 2008. Berkebun Belimbing Manis. <http://www.plantamor.com/indexs.php?plant=164> [15 Mei 2012].
- Sudarsono D, Gunawan S, Wahyuono, Donatus, Purnama. 2002. *Tumbuhan obat II: Hasil Penelitian, Sifat – Sifat, Penggunaan.Cet I.* Yogyakarta: Pusat Studi Obat Tradisional Yogyakarta.
- Sudigdoadi S. 2010, *Analisis Tipe Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Isolat MRSA.* MKB Vol. 42, No. 2. Hlm 149-154.
- Suriawiria U. 2005. *Mikrobiologi Dasar.* Jakarta: Papas Sinar Sinanti. Hlm 47.
- Suryono, Bambang. 2007. *Bakteriologi Umum dan Bakteriologi Klinik.* Semarang: AKK Bhakti Widya. Hlm 212-214.
- Voight R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi.* Soendani N, penerjemah. Indonesia: Gadjah Mada University Press.
- Warso UC. 1994. *Staphylococcus* dalam *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran* edisi Revisi. Jakarta: Penerbit Bina Rupa Aksara.
- Wijayakusuma H. 2005. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Darah Tinggi.* Jakarta: Penebar Swadaya.
- Wijayakusuma H. 2006. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Darah Tinggi.* Jakarta: Penebar Swadaya.
- Wirahjasa IGN. 2012, Pengeloaan Infeksi Akibat Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus.* *Majalah Kedokteran Terapi Intensif:* Vol. 2, No. 3.
- Yuliani S. 2001. *Prospek Pengembangan Obat Tradisional menjadi Obat Fitofarmaka.* *Jurnal Litbag Pertanian Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat.* Bogor. Vol. 20, No.3.
- Yuwono H. 2011. Pandemi Resistensi Antimikroba: belajari dari MRSA, *Universitas Sriwijaya* 1:2837-2850.
- Zakaria ZA, Zaiton H, Henie EFP, Mat Jais MA. 2007. In vitro Antibacterial Activity of *Averrhoa bilimbi* L. Leaves and Fruits Extracts. *International Journal of Tropical Medicine* Vol. 2, No. 3.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Surat Keterangan Determinasi Tanaman belimbing wuluh



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 863375 Fax (0271) 863375
<http://www.biology.mipa.uns.ac.id>, E-mail biologi@mipa.uns.ac.id

Nomor : 191/UN27.9.6.4/Lab/2016
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -

Nama Pemesan : Ani Wijayanti
NIM : 19133955A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Averrhoa bilimbi* L.
Familia : Oxalidaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963):
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74a-75b-76a-77a-78b-103c-104b-106b-107a-108b-109a-110a-111b-112a-113a **53. Oxalidaceae**
1a **3. Averrhoa**
1b ***Averrhoa bilimbi* L.**

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : pohon, tinggi bisa mencapai 5-15 m. Akar : tunggang, putih kotor atau putih kekuningan. Batang : bentuk bulat, berkayu, permukaan batang kasar berbenjol-benjol; percabangan sedikit, arahnya condong ke atas, cabang muda berambut halus seperti beludru, warnanya coklat muda. Daun : tersusun spiral, meninggalkan bekas daun berbentuk jantung atau ginjal pada batang atau cabang, daun majemuk menyirip ganjil dengan 21-45 pasang anak daun; anak daun bertangkai pendek, bentuk bulat telur sampai jorong atau memanjang, panjang 2-10 cm, lebar 1.5-3 cm, ujung runcing, pangkal membandar, tepi rata, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda dan berbulu halus. Bunga : bunga majemuk berupa malai menggantung, berkelompok, keluar dari batang atau percabangan yang besar, panjang perbungaan 5-20 cm, bunga kecil-kecil berbentuk bintang; kelopak bunga 5-7 mm, hijau; daun mahkota bunga bentuk lanset atau spatel, hampir bergandengan atau tidak, panjang 13-20 mm, ungu gelap sampai ungu kemerahan tapi lebih pucat pada bagian pangkalnya; benangari 10, semuanya fertil, yang berhadapan dengan daun mahkota bunga akan menjadi staminodia (steril), panjang 3-4 cm; putik dengan tangkai putik yang sama panjangnya (*homostylus*). Buah : buah buni, bentuknya bulat lonjong bersegi, panjang 4-6.5 cm, beruang 5, tiap ruangan berisi 2-3 biji, warnanya hijau kekuningan, bila masak berair banyak, rasanya asam. Biji : bentuknya bulat telur, gepeng, panjang 6-7 mm.

Surakarta, 23 Desember 2016



Menggetahui
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS

Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si.
NIP. 19660714 199903 2 001

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

Syarifman, S.Si., M.Si.
NIP. 19800705 200212 1 002

Lampiran 2. Gambar daun belimbing wuluh dan serbuk



Foto daun belimbing wuluh



Foto serbuk daun belimbing wuluh

Lampiran 3. Gambar maserasi, penyaringan, pemekatan dan ekstrak kental**Perendaman dengan etanol 70%****Penyaringan filtrat****Pemekatan (evaporasi)****Ekstrak kental**

Lampiran 4. Gambar timbangan, mesin penggiling simplisia dan vortex



Timbangan



Penggiling simplisia

vortex

Lampiran 5. Gambar alat inkubator, autoklaf, oven dan *moisture balance*



Foto inkubator



Foto Autoklaf

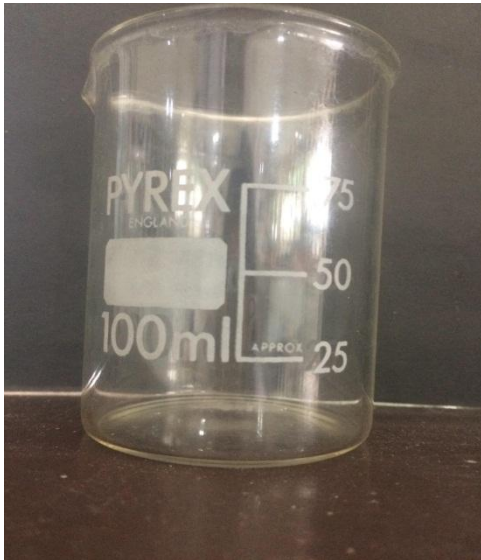


Oven



moisture balance

Lampiran 6. Foto *beaker glass* 100 mL, gelas ukur 10 mL, cawan petri dan mikropipet



***beaker glass* 100 ml**



gelas ukur 10 mL



Cawan petri



mikropipet

Lampiran 7. Foto *yellow tip*, spatula dan pinset



Yellow tip



Spatula



Pinset

Lampiran 8. Foto hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Senyawa

Hasil

Flavonoid



Saponin



Tanin



Lampiran 9. Gambar hasil identifikasi makroskopis, mikroskopis, uji biokimia dan uji hemolisis bakteri MRSA

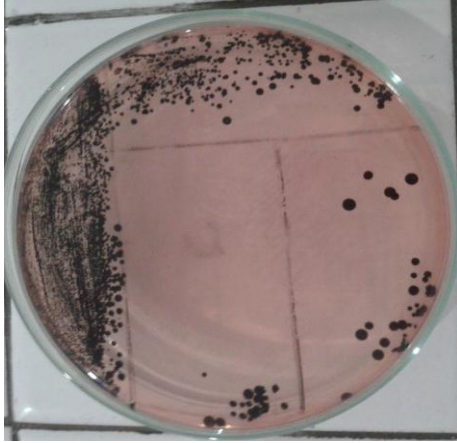


Foto identifikasi makroskopis

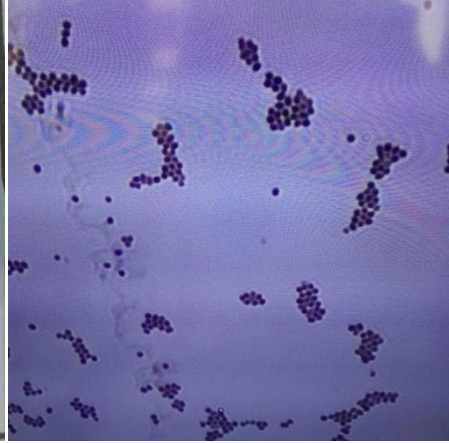


Foto identifikasi mikroskopis



Foto uji katalase



Foto uji koagulase



Foto uji hemolisis

Lampiran 10. Gambar uji sensitivitas MRSA terhadap antibiotik oksasilin, sefoksitin, vankomisin dan uji sensitivitas *S. aureus* terhadap antibiotik oksasilin dan sefoksitin

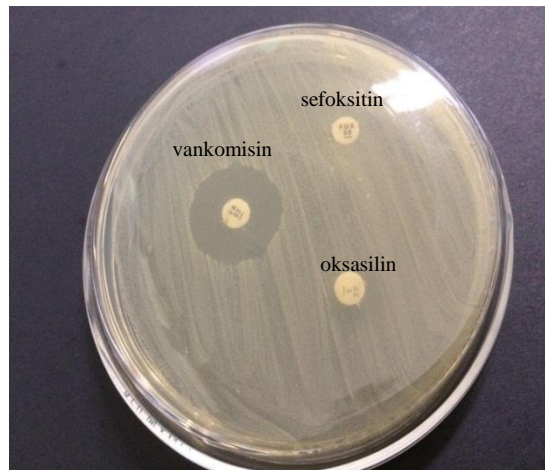


Foto sensitivitas MRSA terhadap antibiotik

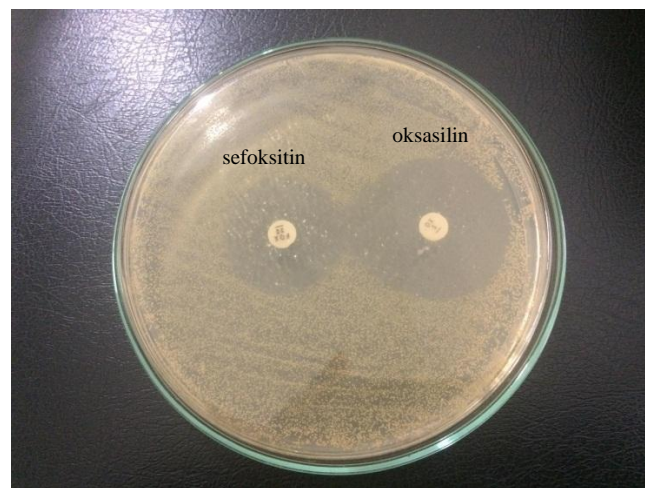


Foto uji sensitivitas *S. aureus* terhadap antibiotik

Lampiran 11. Gambar hasil difusi ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap MRSA dan *S. aureus*

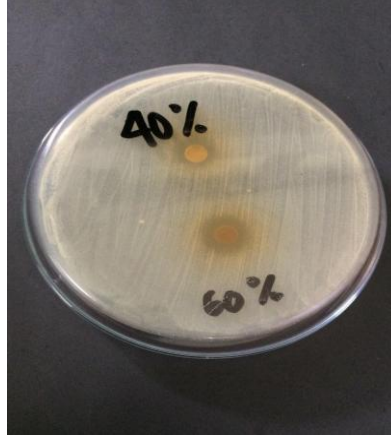


Foto difusi ekstrak terhadap MRSA

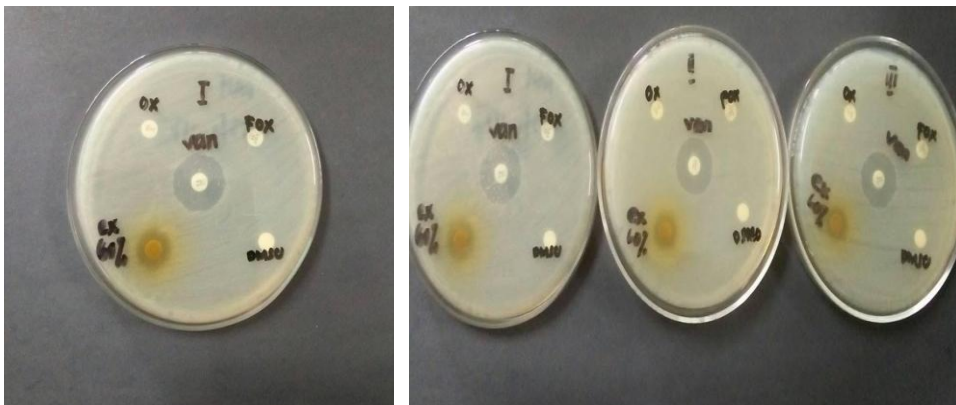


Foto difusi ekstrak konsentrasi 60% terhadap MRSA

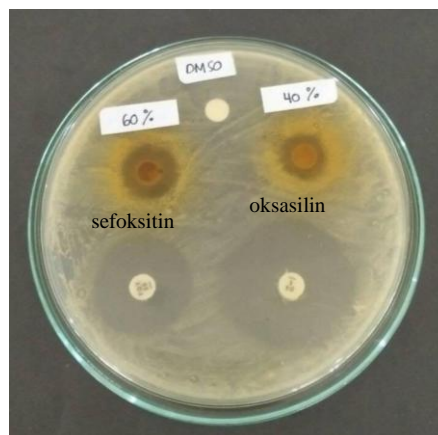
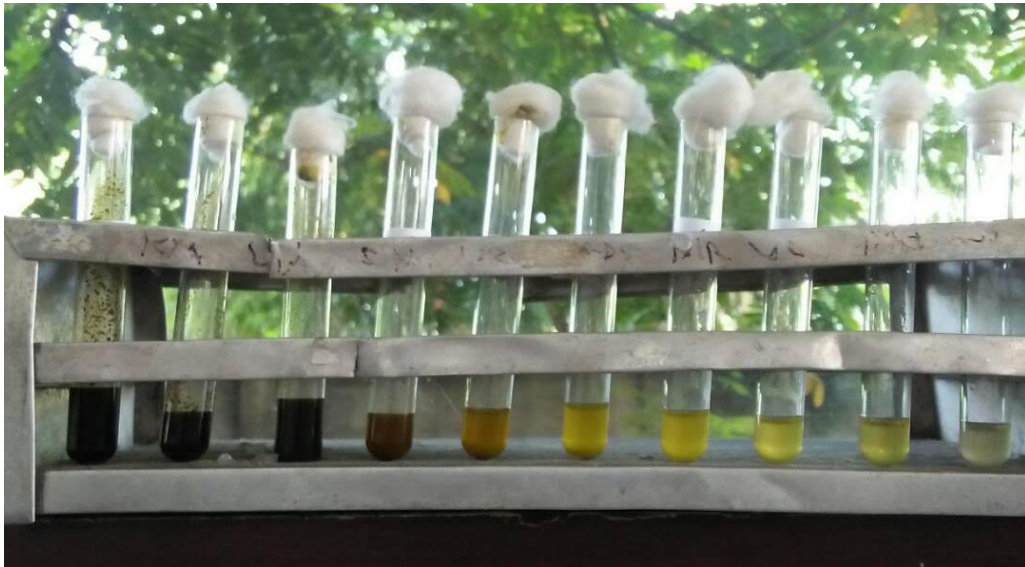
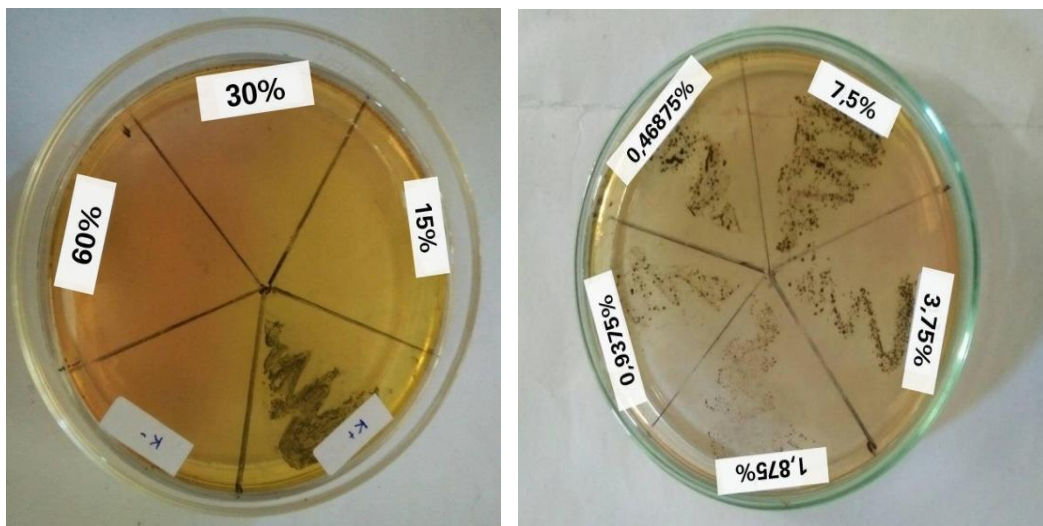


Foto difusi ekstrak terhadap *S. aureus*

Lampiran 12. Gambar hasil dilusi dan inokulasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh terhadap MRSA



Hasil dilusi ekstrak terhadap MRSA



Hasil inokulasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh

Lampiran 13. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah, persen rendemen kadar lembab serbuk dan persen rendemen ekstrak daun belimbing wuluh

Hasil persentase bobot kering terhadap bobot basah daun belimbing wuluh

Bobot basah	Bobot kering	Persentase
7.000 gram	1.100 gram	15,71%

$$\begin{aligned} \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100\% \\ &= \frac{1.100 \text{ (g)}}{7.000 \text{ (g)}} \times 100\% \\ &= 15,71\% \end{aligned}$$

Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun belimbing wuluh

No	Bobot awal (gram)	Bobot akhir (gram)	Kadar lembab serbuk %
1	2	1,91	7,3
2	2	1,92	7,5
3	2	1,92	7,5
		Rata-rata	7,43

Perhitungan kadar rendemen ekstrak

Bobot serbuk (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Belimbing wuluh	Belimbing wuluh	Belimbing wuluh
1000	137,65	13,77

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot serbuk}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{137,65 \text{ gram}}{1000 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 13,77\%$$

Lampiran 8. Pembuatan larutan ekstrak etanol daun belimbing wuluh dengan konsentrasi 40%, 60%, dan DMSO 1%

Larutan ekstrak 40% = % ^b/_v = 40 gram/100 mL

Konsentrasi 40% = 0,4 gram/ mL

= 0,8 gram/ 2 mL

Larutan ekstrak 60% = % ^b/_v = 60 gram/100 mL

Konsentrasi 60% = 0,6 gram/ mL

= 1,2 gram/ 2 mL

DMSO 1% = % ^v/_v = 1 mL/100 mL

= 0,5 mL/50 mL

Lampiran 15. Standar kekeruhan *Mc Farland* dan tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer*

Standar kekeruhan *Mc Farland*

Volume dalam mL			Number of Bacteria/ mL/(10 ⁸) represented
Standard	1% BaCl ₂	1% H ₂ SO ₄	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

tabel *Interpretive Standards Kirby Bauer*

Antimicrobial agent	Disc content (µg) *	Zone diameter breakpoints (nearest mm) *			Jenis antibiotika	Diameter zona hambatan (mm)			
		S	I	R		potensi cakram	Resistant	Intermediate	Susceptible
Methicillin	5	≥ 14	10-13	≤ 9	piperacilin, when testing				
Oxacillin	1	≥ 13	11-12	≤ 10	- <i>P. aeruginosa</i>	100µg	<17	-	>18
Cefoxitin	30	≥ 22	-	≤ 21	- other Gram-negative rods	100µg	<17	18-20	>21
Vancomycin	-	-	-	-	sulfonamide ^{††}	300µg	<12	13-16	>17
Teicoplanin	30	≥ 14	11-13	≤ 10	tetracycline	30µg	<14	15-18	>19
Clindamycin	2	≥ 21	15-20	≤ 14	tobramycin	10µg	<12	13-14	>15
Daptomycin	-	-	-	-	trimethoprim [†]	5µg	<10	11-15	>16
Linezolid	30	≥ 21	-	-	vancomycin, when testing				
Rifampin	5	≥ 20	17-19	≤ 16	- staphylococci	30µg	-	-	>15
Quinupristin-dalfopristin	15	≥ 19	16-18	≤ 15	- enterococci	30µg	<14	15-16	>17
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/23.75	≥ 16	11-15	≤ 10					

*National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests, 6th ed., Vol. 21, No. 1 (M2-A7 and M7-A5) Wayne, PA, NCCLS, 1997; and 11th informational supplement 2001 (M100-S11).

†Amoxicillin and clavulanic acid (inhibitor of β-lactamase).

††Only applicable for testing isolates from urinary tract infection and some enteric pathogens.

‡Sulfonazole

Lampiran 16. Formulasi dan pembuatan media

a. Formulasi dan pembuatan *Brain Heart Infusion* (BHI)

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Proteose peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram

BHI ditimbang sebanyak 37 gram, dilarutkan dalam Aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

b. Formulasi dan pembuatan *Vogel jhonson Agar* (VJA)

Peptone from casein	10,0 gram
Yeast extract	5,0 gram
di-potasium hydrogen phosphate	10,0 gram
D(-)mannitol	10,0 gram
Lithium chloride	5,0 gram
Glycine	10,0 gram
Phenol red	0,025 gram
Agar	13,0 gram

VJA ditimbang sebanyak 61 gram, dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan

autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

c. Formulasi dan pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Beef extract	2,0 gram
Acid Hydrolysate of casein	17,5 gram
Starch	1,5 gram
Agar	17,0 gram

MHA ditimbang sebanyak 38 gram, dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

d. Formulasi dan pembuatan agar darah

3 tetes darah domba dimasukkan dalam cawan petri steril, ditambah 10 ml media *Nutrient Agar* yang telah dicairkan secara aseptis, ratakan sampai homogen dan diamkan sampai media menjadi padat.

Formulasi *Nutrient Agar* (NA)

Ekstrak daging sapi	3,0 gram
Pepton	5,0 gram
Agar	15,0 gram