

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus* Linn) DENGAN METODE
EKSTRAKSI SONIKASI TERHADAP PERTUMBUHAN
Streptococcus pyogenes SECARA *IN VITRO***

(Skripsi)

**Oleh
LUHUT ULI ARTO NAENGGOLAN
1918031020**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL
DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus* Linn) DENGAN METODE
EKSTRAKSI SONIKASI TERHADAP PERTUMBUHAN
Streptococcus pyogenes SECARA *IN VITRO***

**Oleh
Luhut Uli Arto Naenggolan**

**Skripsi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA FARMASI**

Pada

**Program Studi Farmasi
Fakultas Kedokteran Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul Skripsi : **UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus* Linn) DENGAN METODE EKSTRAKSI SONIKASI TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus pyogenes* SECARA *IN VITRO***

Nama Mahasiswa : **Luhut Uli Arto Naenggolan**

No. Pokok Mahasiswa : **1918031020**

Program Studi : **Farmasi**

Fakultas : **Kedokteran**

MENYETUJUI
Komisi Pembimbing


dr. Tri Umiana Soleha, S.Ked., M.Kes
NIP 197609032005012001


apt. Zulpakor Oktoba, S.Si, M. Farm
NIK 232111871023101

MENGETAHUI

Plt. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S.Si, M.T
NIP-197407052000031001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

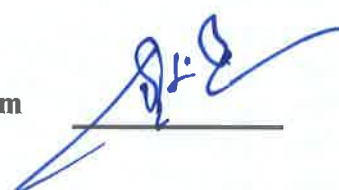
Ketua

: dr. Tri Umiana Soleha, S.Ked., M.Kes



Sekretaris

: apt. Zulpakor Oktoba, S.Si., M.Farm



Penguji

Bukan Pembimbing : Andi Nafisah T.A.M., S.Farm., M.Sc



2. Plt. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S.Si., M.T

NIP: 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **23 Mei 2023**

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa:

Skripsi dengan judul “**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus* Linn) DENGAN METODE EKSTRAKSI SONIKASI TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus pyogenes* SECARA *IN VITRO***” adalah hasil karya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau disebut plagiarisme. Hal intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Atas pernyataan ini, apabila di kemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, April 2023
Pembuat Pernyataan



Luhut Uli Arto Naenggolan
NPM. 1918031020

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Candimas, sebuah desa yang ada di daerah Lampung Selatan, pada tanggal 12 September 2001. Penulis lahir dari pasangan Bapak Horas Naenggolan dan Ibu Endang Sri Wahyuni, dan merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara dengan kakak pertama bernama Putri Sudenni Nainggolan, S.Tr. Keb serta kakak kedua Pitri Ayu Nainggolan, Amd. Keb. Penulis menempuh pendidikan formal pertamanya di SDN 1 Merak Batin pada tahun 2007 dan lulus pada tahun 2013. Kemudian di tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikannya di SMP Yadika Natar hingga lulus pada tahun 2016. Setelah lulus, penulis melanjutkan pendidikan sekolah menengah atas di SMAN 1 Natar dan lulus pada tahun 2019. Pada tahun yang sama, penulis diterima menjadi mahasiswa baru di program studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Pada masa perkuliahan, penulis cukup aktif mengikuti beberapa perlombaan dan bergabung di organisasi intra kampus. Penulis berhasil menjadi finalis Lomba Literatur Review Ar – Razi Competition 2021. Penulis juga pernah diberi kesempatan untuk menjadi Anggota Divisi Perlengkapan dan Keamanan Pharmalation Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung ke-1 dan ke-2, Anggota Divisi Hubungan Masyarakat Mesenterica 2020 *Medical Student Fair and Tracing Creativity*. Selain itu penulis juga menjadi bagian dari organisasi tingkat jurusan yaitu Himpunan Mahasiswa Farmasi Unila selama 2 tahun sebagai Anggota Departemen Kajian, Strategis.

SANWACANA

Puji Syukur penulis sampaikan kehadirat Tuhan yang Maha Esa yang telah melimpahkan segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) Dengan Metode Ekstraksi Sonikasi Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* Secara *In Vitro*”**.

Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bimbingan, masukan, bantuan, dorongan, kritik dan saran dari berbagai pihak. Dengan ini penulis ingin menyampaikan ucapan rasa terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A.IPM selaku Rektor Universitas Lampung;
2. Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S.Si M.T selaku Plt. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
3. dr. Oktafany, M.Pd.Ked selaku Kepala Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
4. dr. Tri Umiana Soleha, S.Ked., M.Kes selaku Pembimbing Pertama yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing dan memberikan masukan sehingga skripsi ini dapat dibuat sebaik mungkin;
5. Bapak apt. Zulpakor Oktoba, S.Si., M.Farm selaku Pembimbing Kedua yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing dan memberikan masukan sehingga skripsi ini dapat dibuat sebaik mungkin;
6. Ibu Andi Nafisah Tendri Adjeng M, S.Farm., M.Sc selaku Pembahas yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberikan masukan dan saran sehingga skripsi ini dapat dibuat sebaik mungkin;
7. apt. Dwi Aulia Ramdini, M.Farm selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan saran dan nasihat, baik urusan akademik maupun nonakademik, dari awal perkuliahan di Fakultas Kedokteran hingga semester ini;

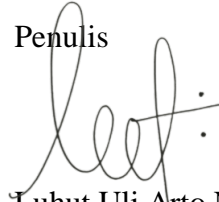
8. Seluruh dosen Fakultas Kedokteran Universitas Lampung atas segala ilmu, yang telah membantu untuk membimbing, dan memberikan pengalaman selama penelitian yang sangat berharga;
9. Seluruh Kepala Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, khususnya Pak Iqbal, Pak Rama, Pak Fitra, dr. Umi dan dr. Intantri atas kesediannya untuk mengizinkan penelitian di Laboratorium;
10. Seluruh staf, civitas dan laboran akademik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, khususnya Vadiyani, Fredison, Denia, Mbak Romi, Mbak Vienda, Mbak Roro dan Mbak Tina yang telah membantu proses persiapan dan pengumpulan data selama penelitian berlangsung sehingga skripsi ini dapat dibuat;
11. Bapak, Mamak, Kak Deni, dan Kak Ayu, atas segala doa, dukungan, semangat, nasihat, perhatian yang sangat berarti dalam proses penyusunan skripsi ini. Terima kasih sudah menjadi keluarga dan memberikan motivasi terbaik penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Terima kasih sudah selalu menjadi garda terdepan di kehidupan penulis;
12. Teman-teman “Ligamentum-Ligand”, angkatan 2019, atas setiap kebersamaan yang telah dilalui terimakasih telah kebersamai penulis selama 8 semester penuh kejutan ini. Semoga segala urusan kita semua dipermudah;
13. Sahabat-sahabat “Orang Sukses Enteng Jodoh”, Regi, Arin, Tasya, dan Winda, yang selalu memberikan perhatian, dukungan, semangat, selalu menjadi teman dalam suka dan duka, teman curhat, selalu bersedia dihubungi ketika penulis mengalami kesulitan, terima kasih sudah selalu ada dan siap membantu penulis dalam menjalani masa perkuliahan dan pengerjaan skripsi hingga selesai;
14. Teman-teman seperjuangan tim bakteri Nana, Afna, Khalim dan Muti yang selalu menemani dan mendukung selama penelitian berlangsung;
15. Teman-teman Himpunan Mahasiswa Farmasi Unila (HIMAFARSI Unila), khususnya teman-teman departemen Kajian, Strategi dan Advokasi yang telah memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman, serta rasa kekeluargaan dalam organisasi;

16. Teman-teman Gereja Jemaat Kristus Di Way Sari khususnya Yoga, Yohanes, Mas Julian dan Mas Ridho yang selalu mendukung penulis baik dalam *drive* dan *support* sehingga penulis sudah berhasil dalam pengerjaan skripsi ini.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan. Penulis berharap agar skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi orang banyak dan dapat memberikan tambahan pengetahuan maupun informasi bagi pembaca.

Bandar Lampung, April 2023

Penulis



Luhut Uli Arto Naenggolan

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF METHANOL EXTRACT WARU LEAF (*Hibiscus tiliaceus* Linn) USING SONICATION EXTRACTION METHOD ON THE GROWTH OF *Streptococcus pyogenes* IN VITRO

By

LUHUT ULI ARTO NAENGGOLAN

Background : *Streptococcus pyogenes* can cause a person to develop an upper respiratory tract infection . The use of the hibiscus plant (*Hibiscus tiliaceus* Linn) as a traditional medicine is an attempt to reduce the high incidence of antibiotic-induced resistance. The sonication extraction method is known to have many advantages compared to conventional extraction methods, especially in terms of inhibiting bacterial growth. This study aims to determine the antibacterial activity of methanol extract of hibiscus leaves (*Hibiscus tiliaceus* Linn) on the growth of *Streptococcus pyogenes* bacteria.

Methods : This research is an experimental study to determine the antibacterial effect of methanol extract of hibiscus leaves by sonication extraction method at concentrations of 10%, 15%, 20%, 25% (*Hibiscus tiliaceus* Linn) against *Streptococcus pyogenes* bacteria.

Results : The results showed that the antibacterial activity of the methanol extract of waru leaves (*Hibiscus tiliaceus* Linn) at concentrations of 10%, 15%, 20% and 25% resulted in an average diameter of the inhibition zone of 10.29 mm, 11.41 mm, 13.63 mm and 14.44mm.

Conclusion : There is antibacterial activity in the methanol extract of hibiscus leaves (*Hibiscus tiliaceus* Linn) against the growth of *Streptococcus pyogenes*.

Keyword : antibacterial, hibiscus leaves, sonication, *Streptococcus pyogenes*.

ABSTRAK

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAUN WARU (*Hibiscus tiliaceus* Linn) DENGAN METODE EKSTRAKSI SONIKASI TERHADAP PERTUMBUHAN *Streptococcus pyogenes* SECARA *IN VITRO*

Oleh

LUHUT ULI ARTO NAENGGOLAN

Latar Belakang : *Streptococcus pyogenes* dapat menyebabkan seseorang mengidap penyakit infeksi saluran pernapasan atas (ISPA). Penggunaan tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) sebagai obat tradisional merupakan upaya untuk mengurangi tingginya kejadian resistensi akibat antibiotik. Metode ekstraksi sonikasi diketahui memiliki banyak sekali kelebihan dibandingkan dengan metode ekstraksi konvensional terutama dalam hal menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Metode : Penelitian ini adalah penelitian eksperimental untuk mengetahui efek antibakteri dari ekstrak metanol daun waru dengan metode ekstraksi sonikasi pada konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25% (*Hibiscus tiliaceus* Linn) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) pada konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25% menghasilkan rerata diameter zona hambat sebesar 10,29 mm, 11,41 mm, 13,63 mm dan 14,44 mm.

Simpulan : Terdapat aktivitas antibakteri pada ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

Kata Kunci : antibakteri, daun waru, sonikasi, *Streptococcus pyogenes*.

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Bagi Para Peneliti	5
1.4.2 Bagi Instansi Terkait.....	5
1.4.3 Bagi Masyarakat.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Waru (<i>Hibiscus tiliaceus</i> Linn).....	6
2.1.1 Definisi Waru	6
2.1.2 Morfologi dan Taksonomi Waru.....	7
2.1.3 Manfaat Waru.....	9
2.1.4 Kandungan Waru Sebagai Antibiotik	10
2.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	11
2.2.1 Definisi dan Morfologi	11
2.2.2 Patogenesis	12
2.3 Ekstraksi.....	13
2.3.1 Definisi Ekstraksi	13
2.3.2 Metode Ekstraksi Konvensional	13
2.3.3 Metode Ekstraksi <i>Ultrasound-Assisted Extraction</i>	16
2.4 Antibakteri	22
2.4.1 Definisi Antibakteri	22
2.4.2 Metode Pengujian Antibakteri	22
2.5 Kerangka Teori.....	25
2.6 Kerangka Konsep	25
2.7 Hipotesis	25

BAB III METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Desain Penelitian.....	26
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	26
3.2.1 Tempat Penelitian.....	26
3.2.2 Waktu Penelitian	26
3.3 Alat, Bahan Uji dan Mikroba Uji Penelitian	27
3.3.1 Mikroba.....	27
3.3.2 Bahan Uji Penelitian.....	27
3.3.3 Media Kultur	27
3.3.4 Alat.....	27
3.3.5 Bahan	28
3.4 Variabel Penelitian	28
3.4.1 Variabel Terikat.....	28
3.4.2 Variabel Bebas	28
3.5 Definisi Operasional.....	29
3.6 Sampel Penelitian.....	30
3.7 Kelompok Perlakuan	30
3.8 Prosedur Penelitian.....	30
3.8.1 Determinasi Daun dan Pembuatan Ekstrak Daun Waru	30
3.8.2 Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Simplisia.....	32
3.8.3 Parameter Non Spesifik dan Spesifik.....	32
3.8.4 Penapisan Fitokimia	32
3.8.5 Sterilisasi Alat	33
3.8.6 Pembuatan Suspensi Bakteri.....	34
3.8.7 Pembuatan Media Mueller Hinton Agar	34
3.8.8 Uji Identifikasi Bakteri	34
3.8.9 Uji Aktivitas Antibakteri	35
3.9 Alur Penelitian	36
3.10 Pengolahan dan Analisis Data.....	37
3.11 <i>Ethical Clearance</i>	38
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	 39
4.1 Hasil.....	39
4.1.1 Hasil Determinasi Tanaman.....	40
4.1.2 Hasil Rendemen Ekstrak.....	40
4.1.3 Hasil Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis.....	41
4.1.4 Hasil Parameter Uji Spesifik dan Non Spesifik.....	45
4.1.5 Hasil Penapisan Fitokimia	47
4.1.6 Hasil Uji Identifikasi Bakteri	49
4.1.7 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri	50
4.1.8 Hasil Analisis Univariat.....	52
4.1.9 Hasil Analisis Bivariat.....	53
4.2 Pembahasan.....	55
4.2.1 Rendemen Ekstrak.....	55
4.2.2 Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis.....	56

4.2.3 Parameter Uji Spesifik dan Non Spesifik.....	57
4.2.4 Penapisan Fitokimia	58
4.2.5 Uji Identifikasi Bakteri	59
4.2.6 Uji Aktivitas Antibakteri	60
BAB V SIMPULAN DAN SARAN.....	65
5.1 Simpulan.....	61
5.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA	67

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Definisi Operasional	29
Tabel 2. Kelompok Perlakuan.....	30
Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Metanol Daun Waru.....	40
Tabel 4. Hasil Pemeriksaan Makroskopis Daun Waru	41
Tabel 5. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Daun Waru.....	43
Tabel 6. Hasil Organoleptik Daun dan Ekstrak Waru	45
Tabel 7. Hasil Kadar Air Daun dan Ekstrak Waru	46
Tabel 8. Hasil Susut Pengeringan Daun dan Ekstrak Waru.....	47
Tabel 9. Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak Waru	47
Tabel 10. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Waru	50
Tabel 11. Hasil Uji Analisis Univariat Ekstrak Waru	52
Tabel 12. Hasil Uji Analisis Normalitas dan Homogenitas	53
Tabel 13. Hasil Uji Analisis <i>One Way Anova</i>	54
Tabel 14. Hasil Uji Analisis <i>Post Hoc</i>	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daun Waru	9
Gambar 2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	12
Gambar 3. Kerangka Teori	25
Gambar 4. Kerangka Konsep	25
Gambar 5. Alur Penelitian	36
Gambar 6. Pewarnaan gram <i>Streptococcus pyogenes</i>	49
Gambar 7. Uji <i>katalase Streptococcus pyogenes</i>	49
Gambar 8. Diameter Zona Hambat	51

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Streptococcus pyogenes atau yang biasa juga dikenal dengan *Group A Streptococcus* (GAS) adalah bakteri patogen yang keberadaannya telah menjadi penyebab morbiditas dan mortalitas tinggi tanpa memandang usia, jenis kelamin, dan etnis (Avire *et al.*, 2021). Prevalensi infeksi akibat *Streptococcus pyogenes* diseluruh dunia sedikitnya ada di angka 18,1 juta kasus penyakit parah dengan 1,78 juta kasus baru dan 517.000 kematian tiap tahun. Selain itu juga dipaparkan bahwa ada 616 juta kasus faringitis dan 160 juta kasus baru impetigo disebabkan bakteri ini setiap tahunnya (Jespersen *et al.*, 2020). Di negara berkembang seperti Indonesia, prevalensi infeksi saluran pernapasan akut (ISPA) yang didalamnya termasuk penyakit faringitis pada tahun 2018 menunjukkan persentase sebesar 9,3% (Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2018).

Streptococcus pyogenes dapat bersifat invasif, dimana bakteri ini bisa menyebabkan seseorang mengidap penyakit infeksi melalui sekresi enzim *kolagenase* atau *hialuronidase* yang merusak substansi interseluler jaringan inang akibatnya bakteri ini menjadi mudah masuk dan menyebar di jaringan (Rini dan Rochmah, 2020). Diantara banyak penyakit infeksi yang dapat disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pyogenes*, penyakit infeksi saluran pernapasan atas (ISPA) seperti faringitis (radang tenggorokan) adalah penyakit paling umum akibat bakteri ini. Selain itu ada infeksi kulit menular seperti impetigo (Joegijantoro, 2019; Siemens dan Lütticken, 2021).

Pengobatan dini melalui penggunaan obat seperti antibiotik sangat penting dilakukan untuk mengurangi transmisi infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes* guna menekan penularan dari individu terinfeksi ke individu sehat lainnya.

Misalnya dengan penggunaan antibiotik dapat menekan bakteri *Streptococcus pyogenes* menular hanya selama 24 - 48 jam namun lain halnya bila tanpa antibiotik yang penularannya dapat berlangsung selama 10 - 21 hari bahkan jauh lebih lama pada kasus yang parah (Avire *et al.*, 2021).

Tidak semua penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Streptococcus pyogenes* berhasil diobati dengan antibiotik (Siemens dan Lütticken, 2021). Penggunaan antibiotik yang tidak rasional seperti ketidaktepatan indikasi, penggunaan antibiotik secara sembarangan dan kesalahan pemberian dosis antibiotik telah memicu terjadinya kejadian resistensi antibiotik (Peters *et al.*, 2017). Selain itu, antibiotik seftriakson, vankomisin, eritromisin, tetrasiklin, kloramfenikol, klindamisin dan levofloksasin dilaporkan juga telah resisten terhadap isolat bakteri *Streptococcus pyogenes* (Kebede *et al.*, 2021). Oleh karena itu, penggunaan antibiotik untuk infeksi bakteri *Streptococcus pyogenes* saat ini disarankan untuk dibatasi penggunaannya mengingat ancaman resistensi antibiotik yang berpotensi mengakibatkan infeksi berulang dan kegagalan dalam pengobatan (Fiedler *et al.*, 2015).

Penggunaan tanaman sebagai obat tradisional merupakan upaya untuk mengurangi tingginya kejadian resistensi akibat antibiotik (Puteri dan Milanda, 2021). Pemanfaatan obat tradisional dari bahan alam di kalangan masyarakat saat ini juga telah menunjukkan *trend* semakin meningkat karena pola pikir *back to nature*, selain itu juga karena efek samping penggunaan obat tradisional yang jauh lebih rendah dibandingkan obat konvensional, keberadaan obat tradisional yang mudah didapatkan dan relatif lebih aman digunakan (Adjeng *et al.*, 2020; Damayanti *et al.*, 2022). Oleh karena itu semakin meningkatnya penggunaan obat tradisional secara turun-temurun harus diikuti dengan penelitian ilmiah yang dapat membuktikan kebenaran khasiat obat tradisional yang terkandung dalam tanaman tersebut (Ruslin *et al.*, 2020).

Tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) adalah salah satu tanaman obat yang memiliki khasiat dalam pengobatan. Telah dilaporkan pada penelitian

sebelumnya bahwa daun, kulit batang, bunga dan akar waru mengandung sedikitnya empat senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin yang memang tergolong sebagai senyawa antibakteri, lebih lanjut penelitian ini juga memaparkan bahwa ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) memiliki potensi aktivitas antibakteri yang diuji dengan tujuh bakteri yaitu bakteri gram positif seperti *S. aureus*, *S. pyogenes*, dan *S. faecalis* maupun gram negatif contohnya *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, dan *P. aeruginosa* dengan diameter zona hambat sebesar 18 mm lebih besar jika dibandingkan dengan bagian batang, bunga dan akar (Rawool dan Parulekar, 2019).

Ekstraksi merupakan langkah awal untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri. Oleh sebab itu pemilihan metode ekstraksi yang tepat adalah dasar untuk mengoptimalkan proses ekstraksi senyawa ini. Sampai saat ini teknik ekstraksi konvensional yang cukup populer digunakan pada ekstraksi daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) seperti maserasi, perkolasi, sokletasi dan refluks memiliki banyak sekali kekurangan seperti waktu ekstraksi yang lama, penggunaan pelarut dalam jumlah besar, hasil ekstrak rendah dan kerusakan zat metabolit sekunder telah menyebabkan penurunan efisiensi dan kualitas ekstrak yang diinginkan (Rao *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2022).

Metode ekstraksi dengan sonikasi atau *Ultrasound-Assisted Extraction* adalah teknologi canggih yang dapat dipilih karena beberapa keunggulannya yaitu mudah digunakan, proses ekstraksi yang cepat, dapat digunakan di suhu rendah dan pelarut yang digunakan sedikit sehingga dapat meningkatkan efisiensi dan kualitas ekstrak. Penggunaan pelarut merupakan faktor penting dalam ekstraksi sonikasi, dimana pada penelitian yang dilakukan oleh Melecchi, (2022) didapatkan penggunaan pelarut metanol pada ekstraksi sonikasi menghasilkan rendemen ekstrak waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) sebesar 13,2% yang lebih tinggi jika dibandingkan pelarut-pelarut lain sehingga didapatkan kandungan senyawa metabolit sekunder dalam jumlah besar yang berimplikasi pada tingginya diameter zona hambat pertumbuhan

bakteri. Hasil ekstrak dari metode ekstraksi sonikasi pada daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) hingga saat ini belum pernah digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Padahal rendemen ekstrak yang dihasilkan jauh lebih tinggi yaitu 13,03% dibandingkan dengan maserasi 1,20%, perkolasi 2,13%, refulks 3,24% atau sokletasi 5,67% (Mounika *et al.*, 2022). Selain itu pada pengujian antibakteri didapatkan bahwa ekstrak yang dihasilkan dari metode sonikasi mampu menghambat pertumbuhan bakteri nyaris sempurna 100% dibandingkan dengan metode maserasi dan sokletasi yang hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri hanya 60-80% (Aguilar-Villalva *et al.*, 2021).

Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui bagaimanakah aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru dengan metode ekstraksi sonikasi sebagai tanaman herbal pengganti antibiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru dengan metode ekstraksi sonikasi sebagai tanaman herbal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) dengan metode ekstraksi sonikasi sebagai tanaman herbal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang ada di dalam ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn).

2. Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) dengan metode ekstraksi sonikasi.
3. Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui morfologi dan anatomi daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) melalui pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis.
4. Tujuan khusus penelitian ini adalah untuk mengetahui parameter spesifik dan non spesifik simplisia dan ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Para Peneliti

Menambah pengetahuan peneliti tentang aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru dengan metode ekstraksi sonikasi sebagai tanaman herbal pengganti antibiotik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.4.2 Bagi Instansi Terkait

Meningkatkan penelitian di bidang *Agromedicine* sehingga dapat menunjang pencapaian visi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung sebagai Fakultas Kedokteran sepuluh terbaik di Indonesia pada tahun 2025 dengan kekhususan *Agromedicine*.

1.4.3 Bagi Masyarakat

Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat daun waru. Dengan harapan meningkatkan kesadaran dan minat masyarakat untuk dapat memanfaatkan daun waru sebagai tanaman obat yang memiliki banyak manfaat untuk kesehatan tubuh.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn)

2.1.1 Definisi Waru

Waru atau yang biasa dikenal dengan nama latin *Hibiscus tiliaceus* Linn termasuk kedalam suku kapas-kapasan (Malvaceae). Tanaman ini memiliki beberapa sebutan yaitu *beach hibiscus*, *sea hibiscus*, *coastal cottonwood*, *tree hibiscus* (inggris), *hau* (hawai), *purau* (tahiti). Di Indonesia memiliki beberapa sebutan yaitu *baru*, *beruk*, *bou*, *buluh*, *kioko*, *melanding*, *siron*, *tobe* (sumatera), *wande*, *waru*, *waru baru*, *waru laut*, *waru lenga*, *waru lengis*, *waru lisah*, *waru lot*, *waru rangkang* (jawa), *dadap laut* (kalimantan), *bau*, *fau*, *kabaru*, *wau* (nusa tenggara), *bahu*, *belebirang*, *lamogu*, *molowagu*, *molowahu* (sulawesi), *balo*, *fanu*, *faru*, *haaro*, *halu*, *haru*, *kalo*, *pa*, *palu*, *papatale*, *war* (maluku) *iwal*, *kasyanaf*, *wakati* (irian jaya). Sedangkan khusus untuk nama simplisia tanaman ini sendiri adalah *Hibiscus tiliaceus* Folium (daun) dan *Hibiscus tiliaceus* Flos (bunga) (Kinho *et al.*, 2011; Suwandi dan Hendrati, 2017).

Waru yang masih semarga dengan kembang sepatu ini merupakan tanaman yang berasal dari pesisir pantai Samudra Pasifik dan Hindia. Namun saat ini penyebarannya sudah sangat meluas sehingga dapat ditemukan di benua Amerika, Afrika, Asia, Australia dan di seluruh kepulauan Pasifik. Tanaman ini dapat tumbuh subur di lingkungan pesisir pantai dan tepi sungai tetapi lokasi seperti di pedalaman hutan dan lembah banyak ditemui di daerah asalnya. Apabila ditinjau dari

iklimnya *Hibiscus tiliaceus* Linn adalah tumbuhan khas yang dapat tumbuh luas di iklim tropis dan subtropis (Husnah *et al.*, 2021).

Hibiscus tiliaceus Linn sudah sangat lama dikenal sebagai pohon peneduh di tepi sungai dan pematang, terutama di tepi pantai. Penamaan waru dalam bahasa inggris dengan sebutan *beach hibiscus* atau *sea hibiscus* bukanlah tanpa alasan. Hal ini dikarenakan pohon waru sangat tahan dengan angin laut yang kencang. Waru juga banyak ditanam di tepi jalan karena akarnya yang tumbuh ke dalam tanah tidak begitu dalam sehingga tidak merusak jalan dan bangunan di sekelilingnya. Selain itu warna bunganya yang indah dipandang mata membuat tumbuhan ini banyak ditanam di depan pekarangan rumah (Dwiyani, 2013; Suwandi dan Hendrati, 2017).

Hibiscus tiliaceus Linn umumnya sangat mudah tumbuh di berbagai lokasi tanpa memandang lingkungan sekitarnya. Tanaman ini akan tumbuh optimum dengan sinar matahari yang cukup serta tanah yang sedikit asam dan berdrainase baik. Apabila di tanam di daerah subur batangnya akan tumbuh lurus tetapi pada tanah yang kurang subur sekalipun tanaman ini tetap dapat hidup dengan adaptasi morfologi berupa batang cenderung membengkok dengan cabang dan daun-daunnya yang melebar (Dwiyani, 2013; Suwandi dan Hendrati, 2017).

2.1.2 Morfologi dan Taksonomi Waru

Akar waru berjenis akar tunggang, warna putih kekuningan, bagian cabang atau ranting dari batang yang turun ke bawah dekat tanah sering tumbuh menjadi akar (Gunawan *et al.*, 2019; Syamsiah *et al.*, 2016).

Batang dapat tumbuh hingga mencapai tinggi 15 m. Ukuran diameter lingkaran batang sedang sekitar 30-50 cm saat sudah tua, batang berbentuk bulat, berkayu, bercabang banyak, berwarna coklat, kulit batang berlenti sel. Pada tanah yang subur batang tanaman ini tumbuh lurus tetapi pada kondisi tanah yang memiliki nutrisi tanah buruk batang akan cenderung tumbuh membengkok dengan percabangan

menyebar. Cabang atau ranting yang mencapai tanah sering tumbuh menjadi akar (Gunawan *et al.*, 2019; Kinho *et al.*, 2011; Kusumanegara *et al.*, 2020; Suwandi dan Hendrati, 2017).

Bunga waru merupakan bunga tunggal, tumbuh pada ujung batang, ukuran besar dengan diameter 12 cm, bunga berbentuk seperti lonceng, bagian pangkal bunga berwarna merah hati agak keunguan, petal saling menindih, mahkota besar, berbentuk seperti kipas dengan panjang 5-7 cm. Kelopak memiliki panjang 2,5 cm. Tabung benang sari keseluruhan ditempati oleh kepala sari kuning. Sedangkan kepala putik berwarna merah marun (Dwiyani, 2013; Gunawan *et al.*, 2019; Kusumanegara *et al.*, 2020; Syamsiah *et al.*, 2016; Suwandi dan Hendrati, 2017; Wong dan Chan, 2022).

Buah waru berbentuk seperti telur berukuran kecil, berwarna coklat, panjang 2-3 cm, pada permukaan buah terdapat semacam rambut-rambut halus lebat yang warnanya kuning keemasan, di dalam buah tersimpan banyak biji, ujung buah meruncing, buah beruang lima tidak sempurna dengan tiap bagian dibagi dua oleh sekat semu, buah ketika sudah tua akan pecah dan membentuk 5 katup terbuka (Dwiyani, 2013; Gunawan *et al.*, 2019; Kinho *et al.*, 2011; Kusumanegara *et al.*, 2020; Suwandi dan Hendrati, 2017).

Biji waru tersimpan rapi di dalam buah waru, biji waru terlindung di dalam buah dikarenakan ditutup oleh kulit dan katup buah, biji memiliki bentuk seperti ginjal, halus, berbintil-bintil kecil, berwarna coklat muda, ukurannya sangat kecil sekitar 0,3-0,4 cm (Gunawan *et al.*, 2019; Kinho *et al.*, 2011; Kusumanegara *et al.*, 2020; Syamsiah *et al.*, 2016; Suwandi dan Hendrati, 2017).

Menurut Gunawan *et al.*, (2019) taksonomi tanaman waru adalah sebagai berikut :



Gambar 1. Daun Waru (Dokumentasi Pribadi)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: Hibiscus
Spesies	: <i>Hibiscus tiliaceus</i> Linn

2.1.3 Manfaat Waru

Tanaman waru ini sudah sangat terkenal sebagai obat tradisional oleh masyarakat. Tanaman waru biasanya dipakai sebagai obat diare, batuk dan amandel. Getah berlendir dari kulit batang, cabang dan kuncup bunga digunakan sebagai pencahar ringan dan sering dioleskan pada perut sebagai pelumas saat nyeri persalinan. (Abdul-Awal *et al.*, 2016; Oktoba, 2018).

Tanaman waru juga banyak dimanfaatkan untuk keperluan manusia. Batang waru banyak dimanfaatkan sebagai kerajinan dari kayu, perkakas dan cinderamata seperti hiasan di kepala (Abdul-Awal *etal.*, 2016; Gunawan *et al.*, 2019; Suwandi dan Hendrati, 2017). Di bali serat dari batang waru dirangkai untuk membuat jaring penangkap ikan dikarenakan kekuatan batangnya yang baik (Dwiyani, 2013).

2.1.4 Kandungan Waru Sebagai Antibiotik

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rawool dan Parulekar, (2019) menunjukkan bahwa ekstrak yang didapat dari *Hibiscus tiliaceus* Linn dari bagian tanaman daun, kulit batang, bunga dan akar memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. faecalis*) dan gram negatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*). Akan tetapi pada penelitian ini menyajikan data yang menunjukkan bagian daun memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dibandingkan dengan kulit, batang, bunga dan akar. Ekstrak daun waru menunjukkan aktivitas antibakteri pada lima bakteri dari tujuh bakteri yang diuji. Pada penelitian ini pula di beritahukan bahwa ekstrak daun, akar, bunga dan akar semuanya positif terhadap empat senyawa metabolit sekunder yakni flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin (Rawool dan Parulekar, 2019).

Flavonoid bekerja dengan menyebabkan kerusakan dinding sel pada bakteri. Tanin bekerja dengan menyerang polipeptida dinding sel sehingga menyebabkan kerusakan dinding sel pada bakteri. Saponin memiliki molekul yang dapat menarik air atau hidrofilik dan molekul yang dapat melarutkan lemak atau lipofilik sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel yang akhirnya menyebabkan hancurnya sel bakteri. Steroid dan terpenoid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis. Sedangkan alkaloid memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri dengan prinsip mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri akibatnya lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh (Putra *et al.*, 2017; Sari, Muhani and Fajriaty, 2017).

2.2 *Streptococcus pyogenes*

2.2.1 Definisi dan Morfologi

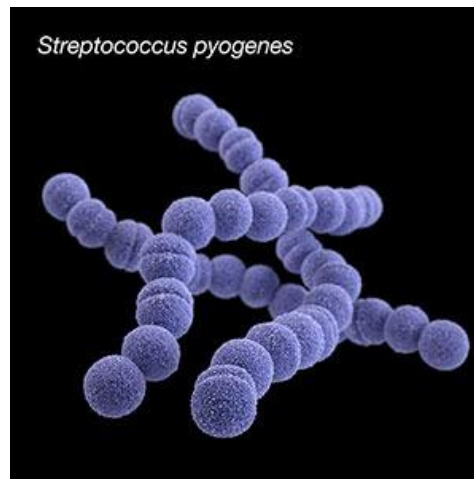
Streptococcus pyogenes adalah bakteri patogen yang menyebabkan penyakit infeksi hampir pada seluruh orang didunia. Infeksi paling umum yang disebabkan oleh bakteri ini adalah faringitis (radang tenggorokan). Selain itu bakteri ini juga dapat menyebabkan infeksi kulit dan jaringan contohnya impetigo. Lebih parahnya lagi infeksi akibat *Streptococcus pyogenes* ditakuti bukan hanya karena penyakit infeksi yang sedang berlangsung tetapi juga karena kemampuan bakteri ini untuk mengakibatkan glomerulonefritis (radang nefron glomerulus) dan demam rematik akut yang terjadi akibat dari kelanjutan pasca infeksi *Streptococcus pyogenes* pada tenggorokan dan kulit (Bryant dan Stevens, 2014; Joegijantoro, 2019).

Streptococcus pyogenes atau yang biasa juga disebut dengan istilah Group A Streptococcus (GAS) adalah bakteri gram positif, dikategorikan sebagai bakteri β -hemolitik dan bersifat *katalase* negatif. Bakteri ini tumbuh sebagai sel bulat atau kokus dengan diameter 0,6 - 1,0 μm terlihat seperti kumpulan atau rantai pendek bakteri. *Streptococcus pyogenes* tidak bergerak, tidak membentuk spora dan bersifat anaerobik fakultatif. Organisme ini tumbuh baik pada suhu 37° C dengan rentang pH 7,4-7,6. (Bryant dan Stevens, 2014).

Streptococcus pyogenes sering membentuk kumpulan seperti rantai dengan penampilan seperti diplokokus yang mencolok. Panjang rantai sangat bervariasi dan dikondisikan oleh faktor lingkungan. Dinding sel *Streptococcus pyogenes* mengandung protein, karbohidrat dan peptidoglikan. Selain itu terdapat rambut seperti pili menonjol melalui kapsul *Streptococcus pyogenes*. (Brooks *et al.*, 2012).

Klasifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes* menurut Krieg (2010) sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacili
Ordo : Lactobacillales
Famili : Streptococcaceae
Genus : Streptococcus
Spesies : *Streptococcus pyogenes*



Gambar 2. *Streptococcus pyogenes* (CDC, 2021)

2.2.2 Patogenesis

Langkah pertama dalam patogenesis penyakit infeksi akibat *Streptococcus pyogenes* adalah kolonisasi bakteri yang berhasil berkembang biak pada mukosa saluran pernapasan bagian atas atau kulit manusia (Bryant dan Stevens, 2014).

Sejumlah faktor besar telah dikaitkan dengan terjadinya patogenesis *Streptococcus pyogenes* terhadap tubuh manusia yaitu protein M, kapsul asam hialuronat, dan protein pengikat fibrinektin. Selama infeksi invasif sejumlah besar protein M dilepaskan dari permukaan sel melalui proteolisis sehingga dapat membentuk kompleks proinflamasi seperti bekuan dengan fibrinogen manusia yang menyebabkan aktivasi

neutrofil tidak terkontrol, kebocoran pembuluh darah dan gejala syok toksik. Selain itu Protein M (bersama dengan kapsul asam hialuronat dan protein permukaan lainnya) memungkinkan *Streptococcus pyogenes* menghindari fagositosis melalui berbagai mekanisme (Nizet dan Arnold, 2018; Peters *et al.*, 2017; Snelling dan Carapetis, 2012).

2.3 Ekstraksi

2.3.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah istilah dalam dunia farmasi yang diartikan sebagai pemisahan senyawa aktif obat dari tanaman atau jaringan hewan dengan menggunakan pelarut selektif dalam prosedur ekstraksi standar (Rasul, 2018). Pada proses ekstraksi akan terjadi kontak secara langsung antara bahan dan pelarut. Selama proses ini berlangsung, secara umum dapat dikelompokkan menjadi tiga fase, yaitu: pelarut yang sesuai akan merusak dinding sel jaringan lalu masuk ke dalam sel, setelah itu pelarut akan melarutkan senyawa metabolit sekunder dan akhirnya pelarut yang telah melarutkan senyawa metabolit sekunder akan dipisahkan guna mendapatkan ekstrak yang akan dipakai (Agung, 2017).

Pemilihan metode ekstraksi sangat tergantung dari bagian tanaman yang diekstraksi dan bahan aktif yang ingin didapatkan. Pemilihan metode ekstraksi yang ideal didasarkan beberapa alasan tertentu seperti sifat bahan alam, kestabilan metabolit sekunder, rendemen ekstrak, kualitas yang diinginkan, maupun karena alasan kemudahan, biaya dan waktu (Agung, 2017; Endarini, 2016).

2.3.2 Metode Ekstraksi Konvensional

Berikut ini adalah beberapa contoh metode ekstraksi yang sering digunakan:

1. Maserasi

Maserasi adalah teknik ekstraksi sederhana yang dilaksanakan dengan merendam bahan baku yang telah disiapkan (dikeringkan

dan dihaluskan) ke dalam pelarut yang sesuai pada bejana dan ditempatkan pada suhu ruang sambil ditunggu untuk beberapa waktu (Agung, 2017). Metode ini adalah metode lama yang digunakan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dan dianggap secara luas sebagai metode yang murah dan praktis digunakan. Maserasi banyak dipilih untuk digunakan karena dapat menyari berbagai senyawa metabolit sekunder yang mudah menguap atau termolabil (Mandal *et al.*, 2015; Rasul, 2018).

Maserasi melibatkan tiga langkah prinsipal. Pertama, bahan tanaman dikecilkan ukurannya menjadi bentuk serbuk halus dengan cara digiling. Setelah penggilingan bahan baku, pelarut sesuai harus dipilih lalu dimasukkan ke dalam bejana tertutup, proses ini dilakukan sekurang-kurangnya tiga hari. Kemudian campuran ini disaring dengan kertas saring sambil ditekan untuk menghindari sejumlah besar larutan yang tersumbat pada kertas saring. Penyaringan akan menghasilkan ampas yang harus ditekan untuk memperoleh bagian cairnya saja. Cairan yang diperoleh biasanya dijernihkan dengan proses dekantasi dan didiamkan selama beberapa waktu. Pengocokan atau pengadukan sesekali dapat mengoptimalkan ekstraksi dengan meningkatkan penetrasi pelarut sehingga didapatkan hasil ekstrak yang lebih banyak (Endarini, 2016; Rasul, 2018).

Proses maserasi dapat diulangi kembali hingga dua atau tiga kali percobaan dengan memakai ampas hasil ekstraksi tahap pertama untuk meningkatkan hasil ekstrak. Hal ini disebabkan karena pada ekstraksi tahap pertama, masih ada sisa senyawa metabolit sekunder yang tertinggal di dalam bahan baku dan berpeluang untuk diambil kembali dalam upaya untuk memaksimalkan total rendemennya (Agung, 2017).

2. Perkolasi

Perkolasi adalah sebuah teknik untuk melarutkan senyawa metabolit sekunder pada suatu bahan yang akan diekstrak dengan cara mengalirkan pelarut yang cocok pada bahan atau simplisia yang telah ditata pada alat perkolator sehingga senyawa metabolit sekunder terbawa pelarut dan mengalir keluar di kran bawah alat perkolator (Agung, 2017; Julianto, 2018).

Sama seperti proses maserasi tahapan ekstraksi dengan metode perkolasi dapat diulangi berkali-kali sampai dirasa proses ini sudah tidak efisien lagi dilakukan. Hal ini dapat dilakukan sampai senyawa metabolit sekunder dalam pelarut sudah terlalu sedikit yang terlihat secara kasat mata dari perubahan warna larutan ekstrak (Agung, 2017).

3. Refluks

Refluks adalah sebuah metode ekstraksi dengan proses penggunaan pelarut berulang melalui proses pemanasan dan pengkondensasian pada sebuah rangkaian alat. Metode ini cukup banyak digunakan dalam skala laboratorium dan menghasilkan rendemen yang cukup tinggi jika dibandingkan dengan metode maserasi atau perkolasi (Agung, 2017).

Pada proses refluks bahan yang ingin di ekstrak akan dicampur dengan pelarut yang sesuai di dalam wadah seperti labu alas dan dipanaskan dalam sebuah alat tertentu (contohnya *water bath*, *heating mantle*, atau *hot plate*). Bagian atas labu dihubungkan dengan kondensor yang berfungsi untuk mengembunkan uap dari pelarut. Selama proses pemanasan, pelarut akan menguap. Pada proses pemanasan ini juga, pelarut akan merusak jaringan dan dinding sel bahan yang menyebabkan pelarut akan mudah menarik senyawa metabolit sekunder. Pada saat pelarut mulai mendidih maka zat-zat yang sudah terlarut akan tertinggal dalam labu alas. Sementara itu pelarut akan menguap, mengembun dan mencair

kembali masuk ke labu alas. Proses ini terus berlangsung berkelanjutan sampai pemanasan dihentikan (Agung, 2017).

4. Sokletasi

Sokletasi adalah proses ekstraksi dengan bantuan pemanasan. Metode ini dilakukan dengan cara mengekstrak bahan yang sudah dihaluskan dan dibungkus kertas saring ke dalam tabung sokletasi yang ditempatkan dalam rangkaian alat. Tepat di bawah labu alas ditempatkan *heating mantle* atau *hot plate* untuk memanaskan pelarut dalam labu alas (Agung, 2017).

Tahapan proses sokletasi dimulai dengan pemanasan pelarut dalam labu yang akan menguap dan terkondensasi kembali karena adanya proses pendinginan sehingga pelarut akan mencair kembali membentuk aliran lalu menyiram dan merendam bahan dalam bungkus kertas saring tadi. Proses ini menyebabkan pelarut dapat mengekstrak bahan dan melarutkan senyawa metabolitnya. Setelah beberapa saat maka campuran akan mencapai volume tertentu dalam tabung sokletasi dan mengalir ke bawah menuju bagian labu alas. Proses ini berlangsung secara terus menerus sehingga membuat sampel larut dalam pelarut (Agung, 2017). Walaupun terkesan sama-sama bekerja dengan mekanisme pemanasan dan pengembunan terus-menerus. Sokletasi dan refluks memiliki perbedaan mendasar dimana pada metode sokletasi bahan baku yang telah dibungkus dalam kertas saring dimasukkan kedalam tabung soklet sedangkan pada proses refluks kontak pelarut dan bahan baku terjadi di labu alas secara langsung (Ngatin dan Hulupi, 2014).

2.3.3 Metode Ekstraksi *Ultrasound-Assisted Extraction*

Ultrasound-Assisted Extraction atau sonikasi adalah sebuah proses ekstraksi menggunakan bantuan gelombang ultrasonik pada frekuensi tertentu untuk menciptakan gelembung kavitas yang pada saat tertentu akan meledak dan menyebabkan degradasi simplisia sehingga senyawa

metabolit sekunder dapat terlarut dalam medium pelarut (Lefebvre *et al.*, 2020). Metode ini secara prinsip bekerja dengan cara mentransmisikan gelombang yang merambat pada media dengan frekuensi tertentu sehingga menginduksi getaran molekul yang secara bergantian memampatkan dan meregangkan struktur medium pada waktu tertentu (Mandal *et al.*, 2015).

Proses pemampatan (kompresi) dan peregangan (ekspansi) yang terjadi secara berkesinambungan akan menyebabkan molekul-molekul tertarik lebih dekat satu sama lain dan terdorong menjauh secara menerus. Jika hal ini secara konsisten berlangsung maka proses ekspansi dapat membentuk gelembung atau rongga dalam cairan. Gelembung ini awalnya berbentuk kecil, lalu membesar dan mengalami ledakan eksplosif di dalam medium yang biasa disebut dengan istilah kavitasi. Ledakan atau letupan ini sangat penting terjadi karena dapat merusak struktur seluler sampel yang ada di dalam media dan memungkinkan perembesan pelarut kedalam sel untuk menyari senyawa metabolit sekunder dengan maksimal (Mandal *et al.*, 2015). Selain itu ledakan ini juga dapat melepaskan sejumlah energi dalam bentuk panas dan meningkatkan tekanan dalam sampel sehingga proses ekstraksi berjalan optimal (Picot-allain *et al.*, 2021).

Kavitasi adalah proses pembentukan, pengembangan dan pemecahan gelembung mikroskopis dalam cairan (Rodrigues dan Fernandes, 2017). Gelembung kavitasi diklasifikasikan menjadi dua jenis yaitu gelembung kavitasi stabil dan sementara. Gelembung kavitasi stabil mengalami banyak siklus kompresi dan ekspansi tetapi tidak mudah pecah. Sedangkan gelombang kavitasi sementara keberadaannya hanya beberapa siklus, dimana gelombang ini akan membentuk volume gelembung sangat besar hingga setidaknya dua kali lipat ukuran awalnya dan menyebabkan dentuman yang keras. Hal ini lah yang menjadi penyebab gelombang kavitasi sementara disebut gelombang kavitasi aktif (Chemat *et al.*, 2016; Khadhraoui *et al.*, 2019).

Jenis-jenis alat *Ultrasound-Assisted Extraction* berdasarkan bentuk alatnya:

1. *Water Bath*

Water bath adalah teknik merendam sebuah bejana yang berisi campuran bahan ke dalam wadah berbahan baja tahan karat yang berisi air dengan satu atau lebih transduser (perangkat untuk mengubah energi listrik menjadi energi mekanik pada frekuensi ultrasonik) yang terpasang di bawah wadahnya (Mandal *et al.*, 2015). Mayoritas *water bath* beroperasi pada frekuensi sekitar 40 KHz. Metode ini banyak digunakan karena biayanya yang rendah, ketersediaannya dan kemungkinan untuk mengolah banyak sampel secara bersamaan (Khadhraoui *et al.*, 2019).

2. *Probe*

Probe berbentuk seperti tongkat yang ujungnya dilengkapi dengan transduser. Transduser ini biasanya direndam atau dibenamkan dalam campuran media cair sehingga menghasilkan gerakan langsung gelembung kavitasi dari ujung *probe* (Khadhraoui *et al.*, 2019). Baik *probe* maupun *water bath* dilengkapi dengan alat generator yang dapat menghasilkan getaran dari daya listrik yang selalu dihubungkan dengan transduser (Mandal *et al.*, 2015). Kebayangkan *probe* menghasilkan frekuensi yang cukup kecil yaitu 20 KHz (Chemat *et al.*, 2016).

Mekanisme ekstraksi pada sonikasi yang terjadi pada bahan telah dilaporkan bukan hanya berasal dari satu mekanisme saja tetapi melalui mekanisme gabungan seperti berikut ini :

1. Fragmentasi

Fragmentasi (pembelahan) dapat terjadi karena tumbukan antar partikel dari gelombang kejut (ledakan) yang terjadi akibat pecahnya gelembung kavitasi di medium cairan. Konsekuensi langsung dari mekanisme ini adalah pengurangan ukuran partikel

dan peningkatan luas permukaan yang dapat meningkatkan hasil rendemen ekstrak (Rodrigues dan Fernandes, 2017).

2. Erosi

Erosi (pengikisan) dapat terjadi juga dikarenakan adanya dentuman akibat proses kavitasi. Erosi dapat meningkatkan aksesibilitas air sebagai pelarut masuk ke dalam sampel sehingga membuat senyawa metabolit sekunder dilepaskan ke medium (Chemat *et al.*, 2016).

3. Sonokapiler

Sonokapiler mengacu pada peningkatan kedalaman dan kecepatan penetrasi pelarut ke dalam pori-pori di bawah kondisi sonikasi. Efek dari sonokapiler secara langsung dapat meningkatkan pembengkakan pada sel dan berkontribusi positif terhadap mekanisme dasar ekstraksi yaitu desorpsi dan difusi zat keluar dari struktur sel (Chemat *et al.*, 2016).

4. Sonoporasi

Sonoporasi adalah pembentukan pori membran pada membran sel yang menyebabkan permeabilitas membran meningkat. Peningkatan porositas membran memungkinkan pelepasan konten intraseluler yang lebih tinggi (Rodrigues dan Fernandes, 2017).

5. Gaya geser lokal

Selama proses sonikasi dengan bantuan gelombang beberapa gaya geser dihasilkan dalam cairan di sekitar bahan yang dapat menyebabkan turbulensi dari letupan gelembung kavitasi di dalam medium. Gaya geser ini dapat menyebabkan pecahnya dinding sel dan peningkatan tekanan dalam kelenjar (Chemat *et al.*, 2016).

6. Deteksturasi

Pada ekstraksi konvensional tidak ditemukan adanya perubahan struktur sel, justru struktur sel tetap utuh sekalipun sel menjadi kosong karena terjadinya perpindahan senyawa metabolit sekunder ke dalam pelarut. Akan tetapi deteksturasi pada ekstraksi sonikasi dapat terjadi pada waktu 30 menit, dimana struktur sel benar-benar

rusak berubah bentuk menjadi wujud yang tidak beraturan (Chemat *et al.*, 2016).

Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan ekstraksi *Ultrasound-Assisted Extraction* adalah sebagai berikut :

1. Daya

Daya adalah laju perpindahan energi oleh gelombang. Daya akan mentransfer energi sehingga menghasilkan perubahan kimia atau fisik pada medium saat digerakan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa daya ultrasonik yang tinggi menyebabkan perubahan besar pada campuran sehingga menginduksi gaya geser yang lebih besar (Chemat *et al.*, 2016).

2. Frekuensi

Frekuensi adalah jumlah getaran yang terjadi tiap satuan waktu. Adanya frekuensi tentunya akan mempengaruhi terbentuknya gelembung kavitas karena timbulnya fase kompresi dan ekspansi. Alat ultrasonik umumnya menggunakan frekuensi diatas rentang frekuensi suara yang dapat ditangkap oleh manusia (20-20.000 Hz), frekuensi alat *Ultrasound-Assisted Extraction* umumnya dimulai dari 20 KHz sampai dengan 100 KHz. Efek dari frekuensi tidak hanya terkait dengan ukuran gelembung kavitas tetapi juga pengaruhnya dalam membantu perpindahan suatu zat dalam medium (Chemat *et al.*, 2016; Lefebvre *et al.*, 2020).

3. Intensitas

Intensitas ultrasonik dinyatakan sebagai energi yang ditransmisikan per meter persegi. Peningkatan intensitas akan meningkatkan terjadinya efek gelembung kavitas. Parameter ini akan menyebabkan gelembung kavitas pecah lebih keras. Proses ini sangat menguntungkan karena pecahnya gelembung kavitas membuat sampel terdegradasi dan hasil ekstrak yang didapatkan meningkat. Perlu diketahui bahwa intensitas selalu berhubungan langsung dengan daya pada alat ultrasonik (Chemat *et al.*, 2016; Khadhraoui *et al.*, 2019).

4. Pelarut

Pemilihan pelarut utamanya ditentukan oleh kelarutan senyawa metabolit sekunder di dalam pelarut yang cocok. Selain itu pemilihan pelarut juga berdasarkan parameter fisik seperti tekanan uap pelarut. Pelarut dengan tekanan uap rendah lebih disarankan digunakan karena ledakan gelembung kavitasi lebih intens terjadi dibandingkan pelarut dengan tekanan uap tinggi (Chemat *et al.*, 2016). Penggunaan pelarut seperti n-heksan harus dipertimbangkan terutama karena sifat dari bahan yang beracun. Pada proses *Ultrasound-Assisted Extraction*, metanol dilaporkan menunjukkan hasil ekstrak yang lebih tinggi dibandingkan etanol (Picot-allain *et al.*, 2021; Rodrigues dan Fernandes, 2017).

5. Suhu

Kenaikan suhu dapat menyebabkan lebih banyak uap pelarut terbentuk yang akibatnya dapat memasuki rongga gelembung yang akan meledak kurang keras sehingga mengurangi efek sonikasi. Akibatnya pada suhu yang lebih tinggi metode sonikasi kurang disukai untuk dipakai karena efek kavitasi yang berkurang. Oleh karena itu penggunaan metode ekstraksi *Ultrasound-Assisted Extraction* lebih disukai pada suhu yang cenderung kecil untuk menghindari efek kavitasi yang berkurang, dimana terdapat efek menguntungkan dari suhu rendah (sekitar 30° C atau kebawah). Penting untuk memilih suhu ekstraksi sesuai dengan target senyawa yang ingin di ekstrak. Oleh karena itu parameter suhu diperlukan untuk mencegah degradasi senyawa termolabil dan menghasilkan rendemen ekstrak yang tinggi tanpa terjadinya kerusakan pada ekstrak, karena bagaimanapun parameter suhu sangat dipengaruhi oleh jenis simplisia yang digunakan (Chemat *et al.*, 2016).

Suhu mempengaruhi ekstraksi sonikasi dengan dua mekanisme yang berbeda: Suhu yang tinggi dapat meningkatkan penetrasi pelarut yang mengarah ke efek positif. Namun hal itu dapat

membahayakan efek kavitasi karena peningkatan tekanan uap air, yang menyebabkan penurunan rendemen ekstrak. Biasanya efek penurunan ini diamati pada suhu 40° – 100° C dalam sistem *water bath* (Rodrigues dan Fernandes, 2017).

2.4 Antibakteri

2.4.1 Definisi Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat menekan pertumbuhan atau bahkan membunuh bakteri. Berdasarkan mekanisme kerjanya antibakteri terbagi menjadi dua, yaitu bakteristatik yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dan bakterisida yang membunuh bakteri. Sedangkan berdasarkan target mekanisme kerja antibakteri dapat dibagi menjadi sebagai berikut : Perusakan membran sel atau dinding sel, perubahan permeabilitas sel, penghambatan kerja enzim dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein (Rollando, 2019).

2.4.2 Metode Pengujian Antibakteri

Metode pengujian antibakteri adalah tes yang digunakan untuk menguji kepekaan suatu bakteri terhadap suatu zat antibakteri. Beberapa metode uji ini dapat di bagi menjadi seperti berikut (Khusuma *et al.*, 2019) :

A. Metode Dilusi

Metode dilusi terdiri dari dua cara yaitu :

1. Dilusi perbenihan cair

Dilusi perbenihan cair adalah metode pengujian antibakteri dasar dimana prosedurnya biasanya melibatkan pengenceran dua kali lipat dari agen antimikroba (Balouiri *et al.*, 2016). Dilusi perbenihan cair dibagi menjadi dua yaitu mikrodilusi dan makrodilusi. Walaupun berbeda pada prinsipnya pengerjaan kedua jenis dilusi ini sama, hal yang membedakan hanyalah volume yang digunakan saja. Makrodilusi menggunakan volume lebih dari 1 ml sedangkan mikrodilusi volume yang digunakan lebih kecil yakni 0,05 sampai

0,1 ml. Pada metode ini pengenceran biasanya digunakan dalam satuan yang kecil ($\mu\text{g/ml}$) (Soleha, 2015).

2. Dilusi agar

Pada teknik ini zat yang ingin diuji aktivitas antibakterinya akan diencerkan, lalu ditambahkan ke dalam agar. Proses ini memerlukan perbenihan agar sesuai dengan jumlah pengenceran, perbenihan tambahan tanpa zat antibakteri biasanya dipakai untuk kontrol. Pada metode ini konsentrasi hambat minimum zat antibakteri dapat diukur dengan menentukan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Soleha, 2015).

B. Metode Difusi

Metode difusi ini dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

1. Cakram (*Disk diffusion*)

Pada metode difusi cakram kertas, cakram yang telah dibubuhkan sejumlah zat antimikroba diletakan pada sebuah media yang sebelumnya sudah dibiakan bakteri yang akan diuji. Penghambatan pertumbuhan organisme uji dapat dilihat penyebarannya dengan melihat adanya zona bening yang terbentuk di sekitar cakram (Soleha, 2015).

2. Cara Parit (*Ditch plate*)

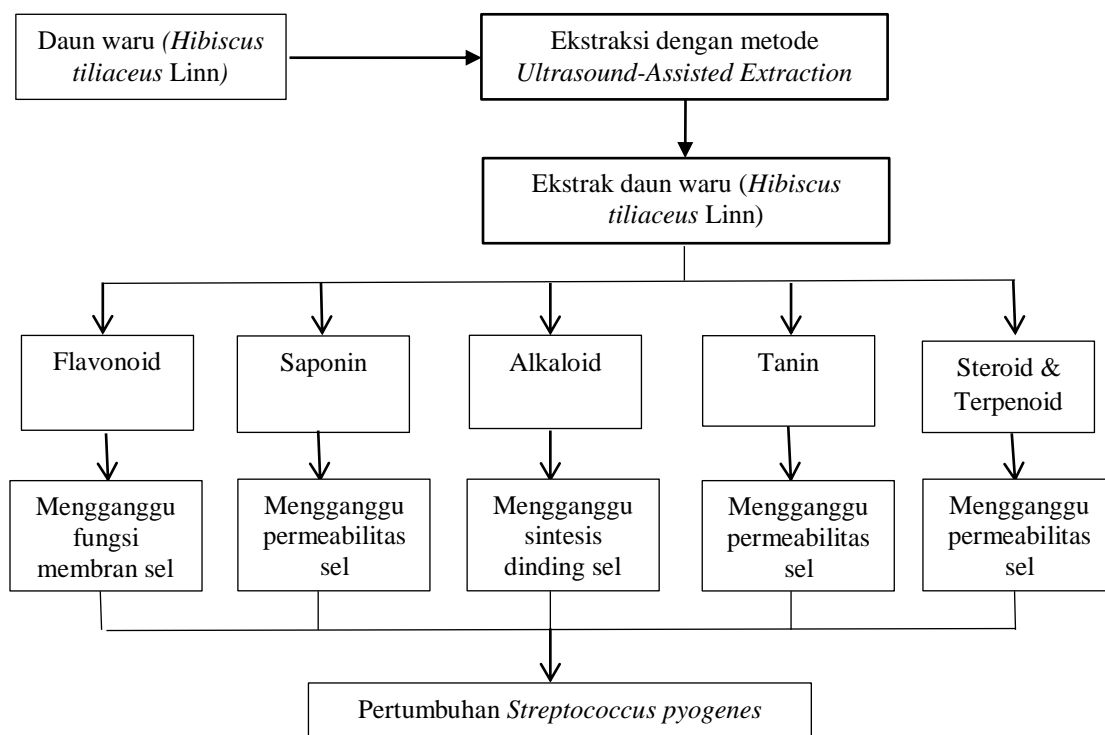
Metode parit dibuat dengan cara memotong media dalam cawan petri di bagian tengah dengan cara membujur kemudian sejumlah zat antibakteri dimasukkan ke dalam parit. Setelah itu sejumlah mikroba uji (jumlah maksimalnya 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba (Etikasari *et al.*, 2017).

3. Cara Sumuran (*Cup/hole plate*)

Cara kerja dari teknik sumuran yaitu dengan cara membuat suatu lubang bulat atau sumuran pada media agar sehingga zat antibakteri dapat dimasukkan di dalamnya (Khusuma *et al.*, 2019). Pembuatan sumuran dilakukan dengan meletakkan pipet steril pada cawan petri dengan pinset sebelum agar dan bakteri dimasukan.

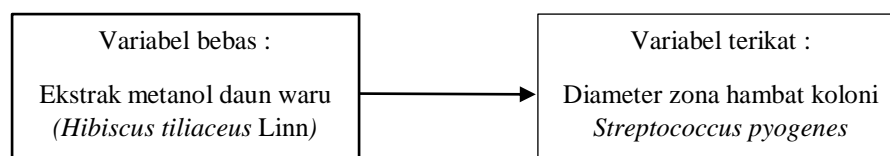
Kemudian itu ditunggu beberapa saat sampai agar memadat. Barulah ketika agar mulai memadat, pipet yang telah kita letakan di cawan diangkat dengan menggunakan pinset steril sehingga membentuk suatu sumuran (Soleha *et al.*, 2015). Cara ini dianggap cukup baik dipakai karena zat akan terdispersi dari permukaan atas media agar sampai ke bawah media agar (Nurhayati *et al.*, 2020).

2.5 Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka Teori

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka Konsep

2.7 Hipotesis

H0 : Tidak terdapat pengaruh aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) terhadap daya hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

H1 : Terdapat pengaruh aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) terhadap daya hambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental untuk mengetahui efek antibakteri dari ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 dan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di :

1. Laboratorium Botani Fakultas MIPA Universitas Lampung.
2. Laboratorium Kimia Farmasi Analisa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
4. Laboratorium Farmasetika Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
5. Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari 2023 - Maret 2023.

3.3 Alat, Bahan Uji dan Mikroba Uji Penelitian

3.3.1 Mikroba

Mikroba uji dalam penelitian ini adalah bakteri gram positif yaitu *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Bakteri ini merupakan biakan bakteri yang didapatkan dari Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.3.2 Bahan Uji Penelitian

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) yang berasal dari desa Candimas Induk I, Kecamatan Natar, Kabupaten Lampung Selatan yang dikeringkan dengan oven pada suhu 50° C selama 30 jam. Kemudian dihaluskan dengan *chopper* hingga menjadi serbuk (Winarti dan Usman, 2015). Lalu serbuk ditimbang sebanyak 984 gram dengan timbangan digital, diayak dengan *mesh* 80 dan diekstrak menggunakan alat sonikator di Laboratorium Kimia Farmasi Analisa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.3.3 Media Kultur

Media kultur yang digunakan pada penelitian ini yaitu Mueller Hinton Agar (MHA) dan Nutrien Agar (NA).

3.3.4 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu *Ultrasonic cleaning bath* (Buchi), pisau (Vicenza), *chopper* (Philips), batang pengaduk (Pyrex®), timbangan analitik (Shimadzu), *rotary evaporator* (Buchi), gelas beker (Pyrex®), cawan petri (ONEMED), tabung erlenmeyer (Pyrex®), rak dan tabung reaksi (Pyrex®), ose (ROFA), kapas steril (One Med), lampu bunsen (Pyrex®), pipet tetes (Pyrex®), pipet mikro (Pyrex®), jangka sorong (Ken Master), autoclave (Gea), dan pipet steril (Pyrex®) Ayakan *mesh* 80 (KZM), Spatula (Pyrex®), Desikator (Pyrex®), Oven (MEMMERT), Silet (Gillette), Pipet Steril (ONEMED), Cawan Porselen (Pyrex®), Lumpang (Pyrex®), Alu (Pyrex®).

3.3.5 Bahan

H₂SO₄(Merck), HCl(Merck), serbuk Mg (Merck), KI (Merck), HgCl₂ (Merck), FeCl₃ (Merck), Mueller Hinton Agar (Merck), Nutrien Agar (Merck), Metanol (Merck), Akuades (Shagufta), Asam Asetat Glacial (Merck), Kloroform (Merck).

3.4 Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel yang dibagi ke dalam dua bagian yaitu variabel terikat dan variabel bebas.

3.4.1 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

3.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) dengan konsentrasi 25%, 20%, 15%, dan 10%.

3.5 Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
1	Ekstrak metanol daun waru (<i>Hibiscus tiliaceus</i> Linn) 25%, 20%, 15%, 10%	Sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari daun waru, lalu pelarut diuapkan hingga tersisa ekstrak saja. Kemudian ekstrak diencerkan menggunakan akuades sehingga konsentrasi 25%, 20%, 15%, 10% (Departemen Kesehatan RI, 2000)	Menggunakan cara : Tambahkan sejumlah gram ekstrak di ad. kan sampai 10 ml akuades dan dilarutkan	Ekstrak metanol daun waru (<i>Hibiscus tiliaceus</i> Linn) 25%, 20%, 15%, dan 10%	Ordinal
2	Daya hambat pertumbuhan bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	Zona bening yang terbentuk pada media yang telah diinokulasikan bakteri di sekitar sumuran yang telah ditaruh ekstrak, kontrol positif dan negatif (Mulyadi, Wuryanti dan Sarjono, 2017)	Menggunakan jangka sorong untuk mengukur zona hambat	Zona hambat pertumbuhan bakteri (mm) Lemah : <14 Intermediet : 14-19 Sensitif : >20 (Sukohar <i>et al.</i> , 2022)	Ordinal

3.6 Sampel Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan perlakuan konsentrasi ekstrak daun waru yang diuji yaitu : 25%, 20%, 15%, dan 10%, serta dilakukan uji kontrol positif dengan memberikan antibiotik amoksisilin sedangkan kontrol negatif menggunakan akuades. Untuk banyaknya pengulangan yang dilakukan adalah 3 kali. Dengan demikian, dari total 6 perlakuan yang dilakukan, setiap kelompok perlakuan mendapatkan 3 kali ulangan sehingga seluruh subjek penelitian berjumlah 18 sampel.

3.7 Kelompok Perlakuan

Tabel 2. Kelompok Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
K(-)	Kelompok <i>Streptococcus pyogenes</i> yang diberikan akuades sebagai kontrol (-)
25%	Kelompok <i>Streptococcus pyogenes</i> yang diberikan ekstrak daun waru dengan konsentrasi 25%
20%	Kelompok <i>Streptococcus pyogenes</i> yang diberikan ekstrak daun waru dengan konsentrasi 20%
15%	Kelompok <i>Streptococcus pyogenes</i> yang diberikan ekstrak daun waru dengan konsentrasi 15%
10%	Kelompok <i>Streptococcus pyogenes</i> yang diberikan ekstrak daun waru dengan konsentrasi 10%
K(+)	Kelompok <i>Streptococcus pyogenes</i> yang diberikan amoksisilin sebagai kontrol (+)

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Determinasi Daun dan Pembuatan Ekstrak Daun Waru

A. Determinasi Daun Waru

Determinasi daun waru akan dilaksanakan di Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.

B. Preparasi Simplisia dan Ekstraksi Daun Waru

Daun Waru diambil pada pukul 09.00 – 10.00 WIB dan diambil bagian daun ke -5 dari pucuk daun. Dilakukan proses sortasi basah

untuk membuang pengotor yang terikut dengan sampel daun (Hidayah N *et al.*, 2021). Lalu daun waru sebanyak 2 kg dicuci terlebih dahulu dengan cara direndam sebanyak 3 kali selama kurang lebih 10 menit pada setiap perendaman lalu ditiriskan. Kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50° C selama 30 jam (Winarti dan Uman, 2015). Untuk memastikan tidak adanya pengotor dilakukan sortasi kering. Kemudian daun waru dihaluskan dengan *chopper* hingga menjadi serbuk dan diayak dengan *mesh* 80. Lalu sebanyak 29 gram serbuk dicampurkan dengan 217,5 ml pelarut metanol (perbandingan serbuk dan pelarut 1 : 7,5) di dalam wadah erlenmeyer 250 ml lalu ditutup atasnya dengan plastik wrap. Sebelum di ekstraksi dengan sonikator terlebih dahulu campuran di aduk dengan *magnetic stirrer* selama 2 menit dengan kecepatan 200 rpm. Setelah itu alat sonikator jenis *water bath* dihidupkan terlebih dahulu dengan mencolokkan steker ke stopkontak. Kemudian wadah *water bath* diisi dengan air sampai garis maksimum (Winata dan Yuniarta, 2015). Barulah erlenmeyer yang telah terisi bahan dan pelarut tadi direndam dalam air dengan menyetel suhu 30° C pada waktu 30 menit di alat sonikator, sedangkan untuk frekuensi sudah terasetel otomatis di alat sebesar 40 KHz. Saat 15 menit awal ekstraksi, larutan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4.000 rpm di dalam alat sentrifugator. Barulah setelah disentrifugasi, larutan diekstraksi kembali selama 15 menit di alat sonikator. Hal ini terus dilakukan hingga serbuk habis terpakai. Kemudian setelah proses ekstraksi selesai campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4.000 rpm untuk mendapatkan supernatannya (Hossain *et al.*, 2015). Kemudian supernatan diuapkan di *rotary evaporator* pada suhu 50° C (Daniswara dan Mujiburohman, 2020). Hasil rendemen ekstrak kemudian dihitung dengan cara dihitung persentase antara berat ekstrak per berat simplisia (FHI Edisi II, 2017).

3.8.2 Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Simplisia

Pemeriksaan makroskopis dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui sifat-sifat morfologi dari daun dilakukan dengan pengamatan langsung dan dibandingkan dengan literatur yang ada. Sedangkan pemeriksaan mikroskopis dilakukan untuk melihat susunan anatomi daun dengan menggunakan mikroskop (FHI Edisi II, 2017).

3.8.3 Parameter Non Spesifik dan Spesifik

A. Parameter Non Spesifik

I. Kadar Air

Ditimbang sebanyak 10 gram sampel lalu masukan kedalam wadah yang sebelumnya telah ditara. Oven pada suhu 105° C selama 5 jam lalu ditimbang. Lanjutkan pengeringan selang 1 jam sampai perbedaan antara dua penimbang berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (FHI Edisi II, 2017).

II. Susut Pengerinan

Timbang 1 gram sampel dalam botol yang sebelumnya telah dipanaskan dan ditara. Ratakan sampel dalam botol lalu keringkan dengan suhu 105° C (FHI Edisi II, 2017).

B. Parameter Spesifik

Parameter Spesifik yang dilakukan adalah uji organoleptik dimana bentuk, bau, warna, rasa dideskripsikan melalui panca indra (FHI Edisi II, 2017).

3.8.4 Penapisan Fitokimia

A. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram sampel ditambah dengan 0,5 gram serbuk Mg dan 5 ml HCl pekat (tetes demi tetes) warna larutan menjadi merah atau kuning dengan timbulnya busa menandakan adanya flavonoid (Harborne, 1987).

B. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram sampel ditetesi kloroform sebanyak 5 tetes dan 5 tetes pereaksi Mayer (1 gram KI dilarutkan dalam 20 ml akuades, lalu ditambahkan 0,271 gram HgCl_2 hingga larut) adanya warna larutan putih kecoklatan menandakan adanya alkaloid (Harborne, 1987).

C. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 gram sampel ditambah 5 ml akuades kemudian dikocok selama 30 detik adanya busa stabil selama 10 menit menandakan adanya kandungan saponin (Harborne, 1987).

D. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 gram sampel ditambah 3 tetes larutan FeCl_3 10% adanya warna larutan hitam kebiruan menandakan adanya kandungan tanin (Harborne, 1987).

E. Uji Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 0,5 gram sampel dicampur dengan 0,5 ml asam asetat glacial dan 0,5 ml H_2SO_4 , terbentuknya warna sampel menjadi biru atau ungu menandakan adanya steroid sedangkan perubahan warna menjadi merah atau kuning menandakan adanya terpenoid (Harborne, 1987).

3.8.5 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat berupa pipet steril dan *yellow tip* dilakukan dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C . Uap air akan memanaskan alat yang digunakan sehingga nantinya dapat terbebas dari mikroorganisme yang menempel di alat. Sedangkan sterilisasi alat yang terbuat dari kaca disterilkan dalam oven dengan suhu 170°C selama 2 jam (Denyer *et al.*, 2004).

3.8.6 Pembuatan Suspensi Bakteri

Biakan bakteri sebanyak 1 ose disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 Mac Farland (CLSI, 2021).

3.8.7 Pembuatan Media Mueller Hinton Agar

Sebanyak 4,56 gram MHA dilarutkan dalam 120 ml akuades di atas penangas. Setelah itu diangkat kemudian dituangkan ke cawan petri. Media lalu disterilkan dengan suhu 121° C selama 15 menit (Sigmaaldrich, 2018).

3.8.8 Uji Identifikasi Bakteri

A. Pewarnaan Gram

1. Fiksasi apusan dengan pemanasan.
2. Teteskan dengan pewarna kristal violet.
3. Kelebihan pewarna dicuci dengan air mengalir.
4. Tetesi apusan dengan larutan garam iodin.
5. Bilas dengan air.
6. Apusan direndam selama 10-30 detik di dalam alkohol 96%.
7. Cuci apusan dengan air mengalir dengan hati-hati.
8. Warnai dengan larutan safranin selama 10-30 detik.
9. Cuci larutan safranin yang berlebih di air mengalir lalu dikeringkan.
10. Apusan diamati di mikroskop (Brooks *et al.*, 2004).

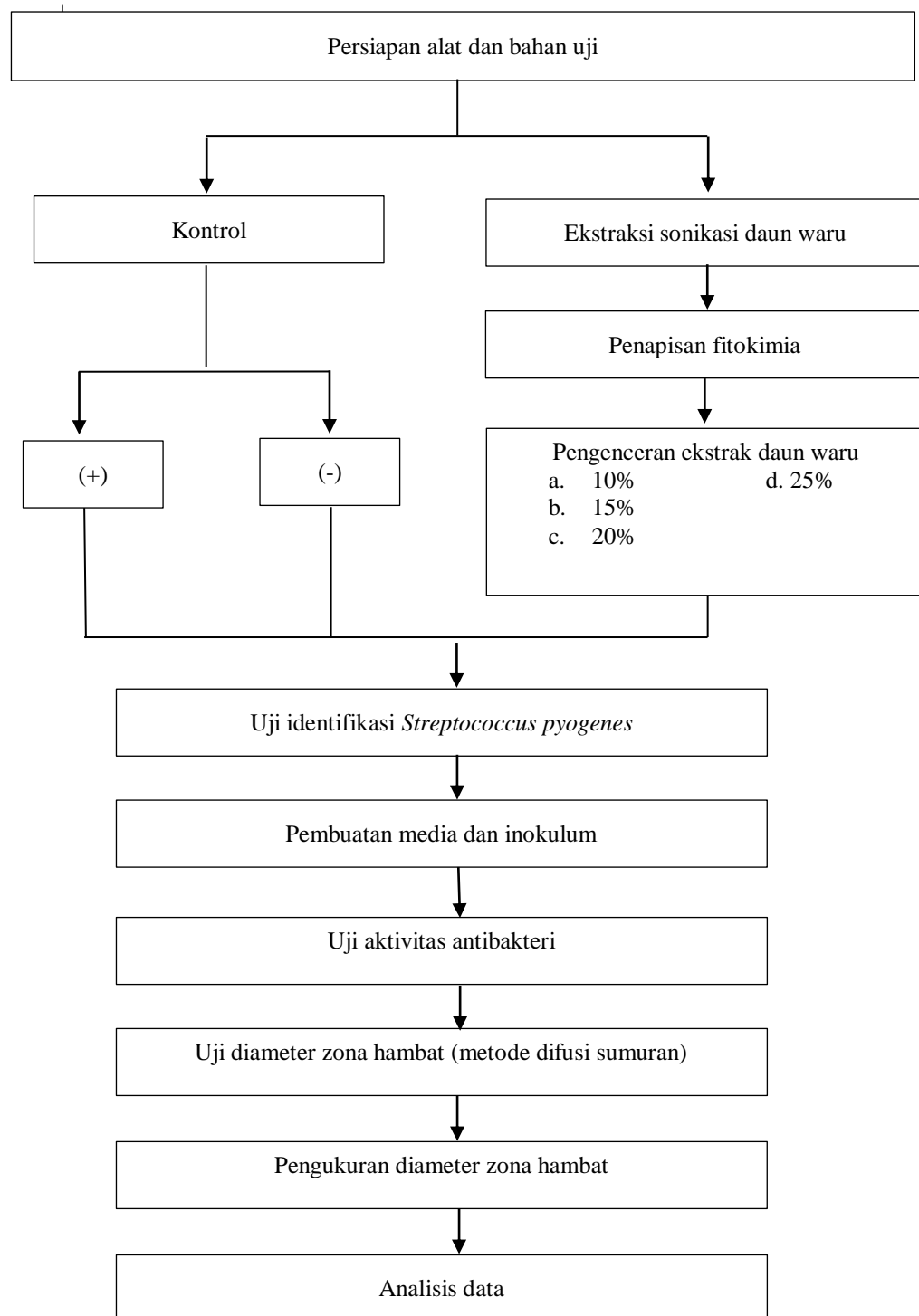
B. Uji *Katalase*

Uji *katalase* dilakukan dengan menambahkan H₂O₂ 3% ke isolat bakteri dan dikatakan *katalase* positif jika terdapat gelembung udara. Bakteri yang memproduksi enzim *katalase* mampu memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂ (Brooks *et al.*, 2004).

3.8.9 Uji Aktivitas Antibakteri

1. Pembuatan sumuran diawali dengan menaruh pipet steril pada cawan petri sebelum media Mueller Hinton Agar yang telah dicampur suspensi bakteri di masukkan.
2. Kemudian dimasukkan Mueller Hinton Agar yang telah dicampur suspensi bakteri dalam cawan petri, lalu ditunggu sampai memadat.
3. Ketika media sudah mulai memadat. Pipet steril yang kita letakan tadi dapat diangkat menggunakan pinset steril.
4. Setelah pipet diangkat maka akan terbentuk lubang sumuran di media dan dapat diberi label bertuliskan 25% (ekstrak konsentrasi 25%), 20% (ekstrak konsentrasi 20%), 15% (ekstrak konsentrasi 15%), 10% (ekstrak konsentrasi 10%), K(+) kontrol positif, dan K(-) kontrol negatif.
5. Lubang sumuran yang telah dibuat kemudian diisi dengan sebanyak 50 µl ekstrak daun waru pada setiap konsentrasi. Sedangkan kontrol positif amoksisilin dan kontrol negatif akuades dimasukkan ke lubang sumuran dengan volume masing-masing sebanyak 50 µl.
6. Setelah itu, media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

3.10 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan data dalam penelitian ini mengikuti langkah-langkah antara lain:

1. *Editing*

Pengecekan kembali data-data yang dikumpulkan dari hasil pengukuran dalam penelitian untuk mendeteksi kesalahan atau eror dalam memasukkan data.

2. *Coding*

Proses dalam mengkode data pada masing-masing hasil pengukuran penelitian yang diatur untuk mempermudah pengolahan data.

3. *Entry dan Processing*

Data yang telah diberi kode akan dianalisis dengan memasukan data tersebut ke dalam program.

4. *Tabulating*

Data-data hasil penelitian yang telah dianalisis dengan program dimasukkan ke dalam tabel sesuai kriteria yang telah ditentukan.

Analisis data menggunakan *software* yang akan mengolah data menjadi 2 macam analisis data, yaitu :

1. Analisis Univariat

Analisis univariat dalam penelitian ini dilakukan untuk menilai *mean* dan standar deviasi.

2. Analisis Bivariat

Data yang sudah diperoleh akan dianalisis menggunakan uji *Saphiro-wilk test* untuk menguji normalitas data. Distribusi data normal jika *p-values* > 0,05 dan jika *p-values* < 0,05 distribusi data tidak normal. Apabila data terdistribusi normal maka digunakan uji statistik *One Way ANOVA* dan dilanjutkan uji homogenitas dengan *Levene test*. Apabila data terdistribusi tidak normal maka digunakan uji alternatif *Kruskal-Wallis*. Analisis ini digunakan untuk menganalisis variabel bebas dan terikat, yaitu untuk mengetahui efektivitas pemberian ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. Hipotesis akan dianggap

bermakna bila hasil $p\text{-values} < 0,05$ dan dianggap tidak bermakna apabila $p\text{-values} > 0,05$.

3.11 *Ethical Clearance*

Etika penelitian adalah perilaku ataupun perlakuan peneliti terhadap subjek penelitiannya. Penelitian sudah mendapatkan persetujuan etik dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selaku institusi tempat penelitian dengan No.397/UN26.18/PP.05.02.00/2023. Surat keterangan persetujuan etik ini terdapat pada **Lampiran 1**.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kandungan senyawa fitokimia yang terkandung dalam ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) pada penapisan fitokimia yaitu saponin, tanin, flavonoid, dan steroid.
2. Ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) dengan konsentrasi 10%, 15%, 20% dan 25% memiliki diameter zona hambat rata-rata sebesar 10,29mm, 11,41mm, 13,63mm, dan 14,44mm. Sedangkan pada kontrol positif yaitu amoksisilin memiliki diameter hambat rata-rata sebesar 27,12 mm dan kontrol negatif tidak memberikan diameter zona hambat.

5.2 Saran

Berdasarkan simpulan dari penelitian ini, penulis menyarankan :

1. Bagi Peneliti Selanjutnya

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai standarisasi daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) yang lain yaitu kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol. Selain itu, dapat dilakukan percobaan lanjutan dengan membuat konsentrasi ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) menjadi lebih besar.

2. Bagi Institusi Pendidikan

Dapat dijadikan sumber informasi ilmiah tambahan dan dijadikan acuan atau referensi bagi penelitian selanjutnya tentang manfaat ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) sebagai data dukung Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, khususnya di bidang *agromedicine*.

3. Bagi Masyarakat

Dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* Linn) sebagai tanaman obat yang memiliki banyak manfaat untuk kesehatan tubuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdul-Awal SM, Nazmir S, Nurunnabi TR, dan Uddin SJ. 2016. Evaluation of pharmacological activity of *Hibiscus tiliaceus*. *Springer Plus*. 5(1): 1–6.
- Adjeng ANT, Akib NI, Lakasa RP, Suryani S, Halimahtussaddiyah R, Sartinah A. 2020. Physical Stability of Hair Tonic Contain Ethanol Extract Galangal (*Alpinia galanga* L.) Rhizome and Aloe Vera Leaf Filtrate (*Aloe vera* L.). *Pharmauho: Jurnal Farmasi, Sains, dan Kesehatan*, 6(2) : 67.
- Agung N. 2017. *Buku Ajar: Teknologi Bahan Alam*. Banjar Baru: Lambung Mangkurat University Press: 155.
- Aguilar-Villalva R *et al.* 2021. Antioxidant capacity and antibacterial activity from *Annona cherimola* phytochemicals by ultrasound-assisted extraction and its comparison to conventional methods. *Arabian Journal of Chemistry* 14(7): 17.
- Agustin DB. 2022. Pengaruh Metode ekstraksi Kulit Biji Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Terhadap Aktivitas Antibakteri *Streptococcus Mutans*. *Jurnal Agrotek Umat*. 6(2): 53–62.
- Avire NJ, Whiley H, dan Ross K. 2021. A review of *Streptococcus pyogenes*: Public health risk factors, prevention and control. *Pathogens*. 10(2): 1–18.
- Balouiri M, Sadiki M, dan Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2): 71–79.
- Beck CB. 2020. *An Introduction to Plant Structure and Development*. 2nd Ed. New York: Cambridge University Press.
- Bell AD. 2021. *Plant Form*. Oxford University Press. Oxford.
- Brooks GF, Carrol KC, Butel JS, Morse SA, dan Mietzner TA. 2012. *Medical Microbiology*. 26th edition: 817.
- Bryant AE dan Stevens DL. 2014. *Streptococcus pyogenes*. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th editon. Elsevier Inc: 2285-2299.

- Centers for Disease Control and Prevention. 2021. *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus). *Streptococcus Laboratory*: 1.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire A, Muellemiestre A, Fabiano-Tixier A, dan Abert-Vian M. 2016. Ultrasound assisted extraction of food and natural products, mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *Ultrasonics – Sonochemistry*: 34.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. 2021. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 31th Edition: 315.
- Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press. New York.
- Damayanti SP, Mariani R, dan Nuari DA. 2022. Studi Literatur: Aktivitas Antibakteri Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Sains*. 9(1): 42–47.
- Daniswara L dan Mujiburohman M. 2020. Isolasi Senyawa Flavonoid dari Limbah Kulit Buah Kakao dengan Variabel *Mesh* Partikel dan Suhu Evaporasi. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”*: 14–15.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tanaman Obat. *Departemen Kesehatan RI*: 37.
- Denyer SP, Hodges NA, dan Gorman SP. 2004. *Pharmaceutical Microbiology*. 7th Edition. Blackwell Science: 441.
- Djufri SCP, Mustapa MA dan Tuloli TS. 2018. Penelitian Standarisasi Parameter Spesifik Ekstrak Kulit Batang Tanaman Waru (*Hibiscus tiliaceus* L) Sebagai Bahan Baku Obat Herbal: 487–501.
- Dwiyani R. 2013. *Mengenal Tanaman Pelindung Di Sekitar Kita*. Denpasar: Udayana University Press: 86.
- Endarini LH. 2016. *Farmakognosi dan Fitokimia*. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan Badan Pengembangan Dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan: 213.
- Etikasari R, Muharyanti R, dan Wiguna AS. 2017. Evaluasi Pigmen Karotenoid Karang Lunak *Sarcophyton* sp. Sebagai Agen Antibakteri Potensial Masa Depan. *Indonesia Jurnal Farmasi*. 2(1): 28–36.
- Fadhliani. 2020. Pengujian Antibakteri Ekstrak Etanol Jukut Pendul (*Kyllinga brevifolia* Rottb) untuk Menghambat Pertumbuhan Bakteri Patogen *Escherichia coli*. *Jurnal Biologica Samudra*. 2(2): 114–120.

- Febriyenti *et al.* 2018. Karakterisasi dan Studi Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Secang (*Caesalpinia sappan* L.). *Sains Farmasi dan Klinis*. 5(1): 23–27.
- Fiedler T, Köller T, dan Kreikemeyer B. 2015. *Streptococcus pyogenes* biofilm-formation, biology, and clinical relevance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*: 1–11.
- Gunawan H, Sugiarti, Wardani M, dan Mindawati N. 2019. *100 Spesies Pohon Nusantara Target Konservasi Ex Situ Taman Keanekaragaman Hayati*. Bogor: IPB Press: 235.
- Hand RM, Snelling TL, dan Carapetis JR. 2011. *40 - Group A Streptococcus. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*. 10th edition. Elsevier Inc: 429-438.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. 3th edition. *Book - Chapman & Hall*: 278.
- Hidayah N, Nurbani SZ, Kusuma J dan Siregar AN. 2021. Identifikasi Senyawa Fitokimia Ekstrak Waru Laut (*Thespesia Populnea*) Dari Pesisir Pantai Semarus Kabupaten Natuna. *Jurnal Bluefin Fisheries*. 2(2): 8.
- Hossain H. *et al.* 2015. HPLC Profiling and Antioxidant Properties of the Ethanol Extract of *Hibiscus tiliaceus* Leaf Available in Bangladesh. *European Journal of Medicinal Plants* 7(1): 7–15.
- Huda C, Putri AE dan Sari DW. 2019. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Dari Maserat *Zibethinus folium* Terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal SainHealth*, 3(1): 7.
- Husnah M, Suhartono S, dan Ismail YS. 2021. A current perspective on antibacterial and antibiofilm properties of waru (*Hibiscus tiliaceus* L.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 711(1): 1–11.
- Jespersen MG, Lacey JA, Tong SYC, dan Davies MR. 2020. Global genomic epidemiology of *Streptococcus pyogenes*. *Infection, Genetics and Evolution*. 86: 1–45.
- Joegijantoro R. 2019. *Penyakit Infeksi*. Malang: *Intimedia*: 217.
- Julianto TS. 2018. *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia*. Universitas Islam Indonesia: 101.
- Kar A. 2008 *Pharmaceutical Microbiology*. New Delhi: New Age International (P) Ltd. 342

- Kebede D, Admas A, dan Mekonne D. 2021. Prevalence and antibiotics susceptibility profiles of *Streptococcus pyogenes* among pediatric patients with acute pharyngitis at Felege Hiwot Comprehensive Specialized Hospital. Northwest Ethiopia. *BMC Microbiology*. 21(1): 1–10.
- Kemenkes. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia*.Kemenkes RI. Edisi 2. Jakarta.
- Kemenkes. 2018. *RISKESDAS 2018*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan: 627.
- Khadhraoui B dan Fabiano-Tixier A. 2019. *Ultrasound technology for food processing, preservation, and extraction*. *Green Food Processing Techniques: Preservation, Transformation and Extraction*: 23-56.
- Khusuma A, Safitri Y, Yuniarni A dan Rizki K. 2019. Uji Teknik Difusi Menggunakan Kertas Saring Media Tampung Antibiotik dengan *Escherichia Coli* Sebagai Bakteri Uji. *Jurnal Kesehatan Prima*. 13(2): 151-155.
- Kinho J *et al.* 2011. *Tumbuhan obat tradisional di Sulawesi Utara jilid 1 (Traditional medicinal plants in North Sulawesi)*. Manado: Balai Penelitian Kehutanan Manado: 106.
- Krieg NR. 2010. *Bergey Manual of Sistematic Bacteriology, Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2th Edition: 931.
- Kusumanegara A, Pribadi EY, Jannah AM, Yuniar N, Utomo HS, dan Ngara DAN. 2020. *Menyingkap Rahasia Jenis-Jenis Tumbuhan Obat Di Taman Nasional Matalawa Sumba-Nusa Tenggara Timur*. Balai Taman Nasional Manupeu Tanah Daru dan Laiwangi Wanggameti: 259.
- Lailiyah M, Sukmana PH dan Yudha PE. 2019. Formulasi Deodoran Roll On Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) pada Konsentrasi 3 %; 5 %; 8 % dan Uji Aktivitas terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Cendekia Journal of Pharmacy*. 3(2) : 106–114.
- Lefebvre T, Destandau E, dan Lesellier E. 2020. Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A Review. *Journal of Chromatography A*: 59.
- Lolok N, Awaliyah N dan Astuti W. 2020. Formulasi Dan Uji Aktivitas Sediaan Sabun Cair Pembersih Kewanitaan Ekstrak Daun Waru (*Hibiscus tiliaceus*) Terhadap Jamur *Candida albicans*. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*. 6(01): 59–80.
- Mandal SC, Mandal V, dan Das AK. 2015. *Classification of Extraction Methods, Essentials of Botanical Extraction*. Elsevier Inc: 83-136.

- Melecchi MIS *et al.* 2022. Chemical composition of *Hibiscus tiliaceus* L. flower: A study of extraction methods. 25: 86–90.
- Melecchi MIS *et al.* 2015. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(3): 242–250.
- Mounika A, Ilangovan B, Mandal S, Yahwant WS, Gali SP, dan Shanmugam A. 2022. Prospects of ultrasonically extracted food bioactives in the field of non-invasive biomedical applications – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 89(1): 24.
- Mulyadi M, Wuryanti W, dan Sarjono PR. 2017. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 20(3): 130–135.
- Najib, A. *et al.* 2017. Standarisasi Ekstrak Air Daun Jati Belanda Dan Teh Hijau. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 4(2): 241–245.
- Ngatin A dan Hulupi M. 2014. Ekstraksi Kulit Buah Manggis secara Refluk dan Sokletasi menggunakan Pelarut Etanol. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi*: 1–4.
- Nizet V dan Arnold JC. 2018. *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus). *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 5th Edition. Elsevier Inc: 715–723.
- Nurhayati LS, Yahdiyani N, dan Hidayatulloh A. 2020. Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt Dengan Metode Difusi Sumuran Dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*. 1(2): 41–46.
- Oktoba Z. 2018. Studi Etnofarmasi Tanaman Obat Untuk Perawatan Dan Penumbuh Rambut Pada Beberapa Daerah Di Indonesia. *Jurnal Jamu Indonesia*. 3(3): 81–88.
- Peters J, Price J, dan Llewelyn M. 2017. Staphylococcal and streptococcal infections. *Medicine (United Kingdom)*. 45(1): 727–734.
- Picot-allain C, Mahomoodally MF, Gunes AK, dan Zengin G. 2021. Conventional versus green extraction techniques — a comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*. 40: 144–156.
- Putra AH, Corvianindya Y, dan Wahyukundari MA. 2017. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Pustaka Kesehatan*. 5(3): 449–45.

- Puteri T dan Milanda T. 2021. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Lidah Buaya (*Aloe vera* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*: Review. *Farmaka*, 14(2): 9–17.
- Rao MV, Sengar AS, Sunil CK dan Rawson A. 2021. Ultrasonication - A green technology extraction technique for spices: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 116: 975–991.
- Rasul MG. 2018. Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages. *International Journal of Basic and Applied Computing (IJBSAC)*. 2(6): 10–14.
- Rawool PP dan Parulekar BC. 2019. Phytochemical screening of *Hibiscus tiliaceus* by FTIR spectroscopic analysis. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 9(3): 1308–1319.
- Rini CS dan Rochmah J. 2020. *Bakteriologi Dasar*. Sidoarjo: UMSIDA Press: 101.
- Rodrigues S dan Fernandes FAN. 2017. Extraction Processes Assisted by Ultrasound, in *Ultrasound: Advances in Food Processing and Preservation*. Elsevier Inc: 351–368.
- Rollando. 2019. *Senyawa Antibakteri Dari Fungi Endofit*. Malang: CV. Seribu Bintang: 94.
- Ruslin, Fitrawan LAM, Pascayantri A, dan Adjeng ANT. 2020. Sosialisasi dan Edukasi Pemanfaatan Tanaman Berkhasiat Obat Dalam Menghadapi Masa Pandemi COVID-19 di Kota Kendari. *Jurnal Mandala Pengabdian Masyarakat*. 1(2): 62–69.
- Santos MB, Sillero L, Gatto DA, dan Labidi, J. 2022. Bioactive molecules in wood extractives: Methods of extraction and separation, a review. *Industrial Crops and Products*. 186: 1–15.
- Santosa H. 2018. Ekstraksi Saponin dari Daun Waru Berbantu Ultrasonik Suatu Usaha Untuk Mendapatkan Senyawa Penghambat Berkembangnya Sel Kanker. *Inovasi Teknik Kimia*: 3(2): 12–16.
- Sari R, Muhani M, Fajriaty I. 2017. Antibacterial Activity of Ethanolic Leaves Extract of Agarwood (*Aquilaria microcarpa* Baill.) Against *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis*. *Pharmaceutical Sciences and Research*. 4(3): 143–154.
- Siemens N dan Lütticken R. 2021. *Streptococcus pyogenes* (“group a streptococcus”), a highly adapted human pathogen—potential implications of its virulence regulation for epidemiology and disease management. *Pathogens*. 10(6): 1–17.

- Sigmaaldrich. 2018. Mueller Hinton Agar (M-H Agar): 1–2.
- Sinaga H. 2019. Uji Daya Hambat Infusa Mahkota Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Herbal Medicine Journal*, 2(2): 9–15.
- SMIS (UK Standards for Microbiology Investigations). 2014. Catalase Test. *Bacteriology Test Procedures*, 8 (3): 1-13.
- Snelling TL dan Carapetis JR. 2012. *Group A Streptococcus*. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*: 9th Edition. Elsevier Inc: 391-401.
- Soleha TU. 2015. Uji Kepekaan terhadap Antibiotik Susceptibility Test of Antimicroba. *Juke Unila*. 5(9): 120–123.
- Soleha TU, Carolia N, dan Kurniawan S. 2015. The Inhibition Test Of Red Betel Leaves (*Piper crocatum*) Towards *Staphylococcus aureus* And *Salmonella typhi*. *J Majority*. 4(5): 117–122.
- Sukohar A, Armadany I, Bakede NAF, Malaka MH, Ramdini DA dan Adjeng ANT. 2022. Antimicrobial Activity of *Syzygium aromaticum* L. Leaves Essential Oil against *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 15(12): 5672–5676.
- Surjowardojo P, Susilorini TE dan Sirait GRB. 2016. Daya Hambat Dekok Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas* sp. Penyebab Mastitis Pada Sapi Perah. *Jurnal Ternak Tropika*. 22(2): 104–107.
- Suwandi dan Hendrati RL. 2017. *Perbanyak Vegetatif dan Penanaman Waru (Hibiscus tiliaceus)*. Edisi Pertama. Yogyakarta: IPB Press: 24.
- Syamsiah *et al.* (2016) *Tumbuhan Obat Tradisional Etnis Lokal Sulawesi Barat*. Alauddin University Press. Makassar: 1-95.
- Taufiq S, Yuniarni U, dan Hazar S. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 110(9): 654–661.
- Tsabitah AF, Zulkarnain AK, Wahyuningsih MSH, dan Nugrahaningsih AG. 2020. Optimasi Carbomer, Propilen Glikol, dan Trietanolamin Dalam Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*). *Majalah Farmaseutik*. 16(2): 111-118.

- Virgianti DP dan Purwati DM. 2015. Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pyogenes* Secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan dan Farmasi*. 13(1): 24–27.
- Voight, R. 1994. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi V. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada Press. Hal: 570-571
- Winarti S dan Usman DS. 2015. Karakteristik Dan Aktivitas Antioksidan Rosela Kering (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Jurnal Rekapangan*. 9(2): 17–24.
- Winata EW dan Yunianta. 2015. Ekstraksi Antosianin Buah Murbei (*Morus alba* L.) Metode Ultrasonic Bath (Kajian Waktu dan Rasio Bahan : Pelarut). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(2): 773–783.
- Wong SK dan Chan EWC. 2022. Botany, uses, phytochemistry and bioactivities of mangrove associates I : *Hibiscus tiliaceus*. *ISME/GLOMIS Elestronic Journal*. 20(3): 17–22.