

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAUN
BELIMBING MANIS (*Averrhoa carambola* L) MENGGUNAKAN
METODE *ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION*
TERHADAP BAKTERI *Streptococcus pyogenes*
SECARA *IN VITRO***

(Skripsi)

**Oleh:
SITI NUR HASANAH
1918031026**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAUN
BELIMBING MANIS (*Averrhoa carambola* L) MENGGUNAKAN
METODE *ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION*
TERHADAP BAKTERI *Streptococcus pyogenes*
SECARA *IN VITRO***

**Oleh
Siti Nur Hasanah**

**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 BELIMBING MANIS (*Averrhoa carambola* L) MENGGUNAKAN METODE *ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION* TERHADAP BAKTERI *Streptococcus pyogenes* SECARA *IN VITRO***

Nama Mahasiswa : Siti Nur Hasanah

No. Pokok Mahasiswa : 1918031026

Program Studi : Farmasi

Fakultas : Kedokteran




dr. Tri Umiana Soleha., M.Kes

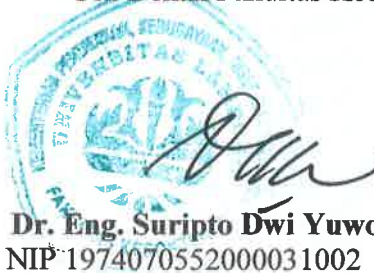
NIP. 197609032005012001


Afriyani, M.Farm

NIP. 199504172022032022

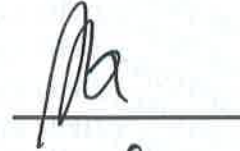
MENGETAHUI

Plt. Dekan Fakultas Kedokteran


Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S.Si, M.T
NIP. 1974070552000031002

1. Tim Penguji

Ketua : **dr. Tri Umiana Soleha., M.Kes**

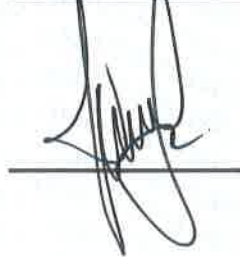


Sekretaris : **Afriyani, M.Farm**



Penguji

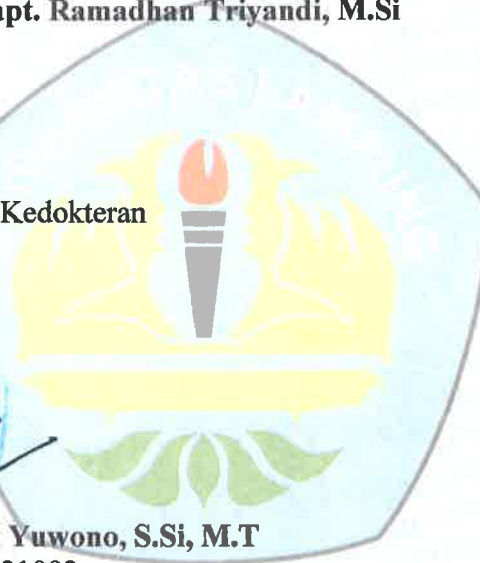
Bukan Pembimbing : **apt. Ramadhan Triyandi, M.Si**



2. Plt. Dekan Fakultas Kedokteran



Dr. Eng. Satripto Dwi Yuwono, S.Si, M.T
NIP. 1974070552000031002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **26 Mei 2023**

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

Skripsi dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAUN BELIMBING MANIS (*Averrhoa Carambola* L) MENGGUNAKAN METODE *ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION* TERHADAP BAKTERI *Streptococcus Pyogenes* SECARA *IN VITRO*”** adalah hasil karya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan 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



Siti Nur Hasanah

NPM. 1918031026

RIWAYAT HIDUP

Siti Nur Hasanah lahir di Metro pada tanggal 28 Juni 2002. Penulis merupakan anak ketiga dari empat bersaudara yang lahir dari pasangan Bapak Zaidir Anis dan Ibu Else Hasan. Penulis memiliki dua orang kakak dan seorang adik yaitu, Elza Anisah Putri, Clarisa Rahmawati Putri, dan Desisya Nurjanah. Riwayat pendidikan penulis SD Muhammadiyah Metro Pusat sejak tahun 2007 kemudian melanjutkan pendidikan menengah pertama di SMPN 1 Metro pada tahun 2014 dan lulus pada 2017. Dari pendidikan menengah pertama penulis melanjutkan pendidikan menengah atas di SMAN 1 Metro pada tahun 2017 dan berkesempatan mengikuti kelas dua tahun sehingga penulis dapat lulus pada tahun 2019. Di tahun yang sama penulis melanjutkan pendidikan tingkat perguruan tinggi dan diterima sebagai mahasiswa baru di Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Penulis melaksanakan masa perkuliahan dengan menyeimbangkan kegiatan akademik dan kegiatan non-Akademik. Penulis berkesempatan beberapa kali menjadi asisten praktikum pada mata kuliah Farmasetika Dasar, Farmakologi dan Toksikologi, dan Teknologi Sediaan Semisolid dan Liquid. Penulis berkesempatan mengikuti kegiatan MBKM. Penulis juga ikut dalam kegiatan pengabdian masyarakat bersama dengan dosen Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

Penulis berkesempatan bergabung dalam organisasi baik di tingkat universitas, fakultas, maupun program studi. Staf dana usaha UKM-U Saintek, Staf departemen kemuslimahan FSI Ibnu Sina FK Unila, Sekertaris dan wakil kepala departemen pendidikan dan keilmuan Himpunan Farmasi Unila.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Bismillahirrahmanirrahim

بَلِ اللَّهُ مَوْلَاكُمْ وَهُوَ خَيْرُ النَّاصِرِينَ

Tetapi hanya Allah-lah pelindungmu, dan Dia penolong terbaik

Q.S. Al-Imran : 150

*Sebuah persembahan sederhana untuk keluargaku tercinta
Papa, Mama, Uni Putri, Uni Risa, dan Sasa*

-Nana-

SANWACANA

Puji syukur penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT, karena atas nikmat, rahmat, dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Belimbing Manis (*Averrhoa Carambola L*) Menggunakan Metode *Ultrasonic Assisted Extraction* terhadap Bakteri *Streptococcus Pyogenes* Secara *In Vitro*”.** Dan tak lupa shalawat serta salam penulis curahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW.

Penulis menyadari bahwa selama melaksanakan perkuliahan di Program Studi Farmasi dan selama menyelesaikan skripsi ini, penulis mendapatkan bimbingan, bantuan, masukan, arahan, dorongan, kritik dan saran dari berbagai pihak sehingga segalanya dapat berjalan dengan baik dan lancar. Dengan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat-Nya selama penulis melaksanakan perkuliahan dan penelitian skripsi.
2. Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A.IPM. sebagai Rektor Universitas Lampung;
3. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S.Si M.T selaku Plt. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung;
4. dr. Oktafany, S.Ked., M.Pd.Ked selaku Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung
5. dr. Tri Umiana Soleha., M.Kes, selaku Pembimbing Utama yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran serta memberikan masukan dan dorongan kepada penulis. Terimakasih atas ilmu, arahan, serta masukan dalam proses penyusunan skripsi ini.

6. Afriyani, M.Farm, selaku Pembimbing Kedua yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran serta memberikan masukan dan dorongan kepada penulis. Terimakasih atas ilmu, arahan, serta masukan dalam proses penyusunan skripsi ini.
7. apt. Ramadhan Triyandi, M.Si, selaku Pembahas yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran serta memberikan masukan dan dorongan kepada penulis. Terimakasih atas ilmu, arahan, serta masukan yang membangun dalam menyempurnakan penyusunan skripsi ini.
8. apt. Mirza Junando, M.Farm.Klin selaku Pembimbing Akademik yang selalu memberikan saran akademik, nasihat dan bimbingan selama masa perkuliahan.
9. Seluruh dosen Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat selama proses perkuliahan.
10. apt. Muhammad Iqbal, M.Sc selaku kepala Laboratorium Kimia Farmasi yang telah membimbing peneliti saat melakukan penelitian di Laboratorium Kimia Farmasi FK.
11. Seluruh Laboran yang sudah membantu peneliti selama proses penelitian di laboratorium yaitu Laboran Kimia Farmasi FK, Laboran Laboratorium Farmasetika FK, Laboran Laboratorium Mikrobiologi FK, Laboran Laboratorium Botani FMIPA, Laboran Laboratorium Kimia Organik FMIPA.
12. Fredison, Vadiyani, dan Denia yang telah membantu peneliti selama proses penelitian di Laboratorium Kimia Farmasi FK.
13. Seluruh staf dan civitas akademik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung yang telah membantu proses penyusunan skripsi ini.
14. Papa Zaidir Anis dan Mama Else Hasan sebagai orangtua tecinta penulis yang selalu mendoakan dan mendukung penulis dalam setiap langkah perjalanan penulis hingga titik ini.
15. Uni Putri, Uni Risa, dan Sasa sebagai kakak dan adik penulis yang selalu menyemangati dan mendukung penulis dikala perkuliahan dan menyelesaikan skripsi.

16. Keluarga besar penulis yang selalu memberikan doa dan dukungan selama proses pengerjaan skripsi.
17. Tiara sebagai sahabat penulis yang selalu kebersamai penulis dalam proses pendewasaan diri. Sahabat yang selalu dapat diajak bertukar pikiran, mendengarkan keluh kesah, dan memberikan saran kepada penulis.
18. Nungky dan Halim sebagai teman terbaik yang selalu menemani penulis dari awal semester perkuliahan hingga akhir semester perkuliahan.
19. Luhut dan Sekar sebagai teman seperbimbingan penulis yang selalu kebersamai penulis dalam menyelesaikan skripsi.
20. Tim bakteri murni (Luhut, Halim, Afna, dan Muti) sebagai teman penelitian yang selalu membantu penulis dalam proses penelitian.
21. Kepada seluruh pihak yang sudah mendukung penulis dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

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



Siti Nur Hasanah

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF METHANOL EXTRACT OF STARFRUIT LEAF (*Averrhoa carambola L*) USING *ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION* METHOD ON THE GROWTH OF *Streptococcus pyogenes* *IN VITRO*

By

SITI NUR HASANAH

Background : *Streptococcus pyogenes* causes skin infections that are both invasive and non-invasive. Starfruit (*Averrhoa carambola L*) can be used as an alternative to reduce the high incidence of antibiotic resistance. Modern *Ultrasonic Assisted Extraction* methods have many advantages compared to conventional extraction methods, especially in inhibiting bacterial growth activity. This study aims to determine the antibacterial activity of methanol extract of starfruit leaf (*Averrhoa carambola L*) on the growth of *Streptococcus pyogenes*.

Methods : This research is an experimental study to determine the antibacterial effect of methanol extract of starfruit leaf by *Ultrasonic Assisted Extraction* method at concentrations of 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% (*Averrhoa carambola L*) against *Streptococcus pyogenes*.

Results : The results showed that there was antibacterial activity of the methanol extract of starfruit leaves (*Averrhoa carambola L*) with the average diameter of the inhibition zones obtained being 11.48 mm, 13.00 mm, 14.66 mm and 16.10 mm which were included in the strong category.

Conclusion : There is antibacterial activity in the methanol extract of starfruit leaf (*Averrhoa carambola L*) against the growth of *Streptococcus pyogenes*.

Keyword : *Antibacterial, Averrhoa carambola L, Ultrasonic Assisted Extraction, Streptococcus pyogenes*

ABSTRAK

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL DAUN BELIMBING MANIS (*Averrhoa carambola* L) MENGGUNAKAN METODE *ULTRASONIC ASSISTED EXTRACTION* TERHADAP BAKTERI *Streptococcus pyogenes* SECARA *IN VITRO*

Oleh

SITI NUR HASANAH

Latar Belakang : *Streptococcus pyogenes* menyebabkan penyakit infeksi kulit yang bersifat inasif maupun non-invasif. Tanaman belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) dapat digunakan sebagai alternatif untuk mengurangi tingginya kejadian resistensi akibat antibiotik. Metode ekstraksi modern *Ultrasonic Assisted Extraction* memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan metode ekstraksi konvensional terutama dalam menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Metode : Penelitian ini adalah penelitian eksperimental untuk mengetahui efek antibakteri dari ekstrak metanol daun belimbing manis dengan metode ekstraksi sonikasi pada konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 100% (*Averrhoa carambola* L) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) dengan rerata diameter zona hambat yang didapatkan sebesar 11.48 mm, 13.00 mm, 14.66 mm and 16.10 mm yang termasuk kedalam kategori kuat.

Kesimpulan : Terdapat aktivitas antibakteri pada ekstrak metanol daun belimbing (*Averrhoa carambola* L) terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes*.

Kata Kunci : Antibakteri, *Averrhoa carambola* L, *Ultrasonic Assisted Extraction*, *Streptococcus pyogenes*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN UTAMA.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
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	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Bagi Peneliti.....	5
1.4.2 Bagi Masyarakat	5
1.4.3 Bagi Institusi	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Belimbing Manis.....	6
2.1.1 Klasifikasi	6
2.1.2 Karakteristik.....	7
2.1.3 Kandungan dan Manfaat Belimbing Manis	7
2.2 Simplisia	9
2.2.1 Pengertian Simplisia	9

2.2.2 Proses Pembuatan Simplisia	10
2.3 Ekstraksi.....	11
2.3.1 Pengertian Ekstraksi	11
2.3.2 Metode Ekstraksi	14
2.4 Senyawa Kimia Tanaman	19
2.5 <i>Streptococcus pyogenes</i>	20
2.5.1 Pengertian	20
2.5.2 Klasifikasi Bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	22
2.6 Antibakteri	22
2.7 Metode Pengujian Antibakteri	23
2.7.1 Metode Dilusi	23
2.7.2 Metode Difusi	24
2.8 Kerangka Teori	27
2.9 Kerangka Konsep.....	28
2.10 Hipotesis	28
2.10.1 Hipotesis Null	28
2.10.2 Hipotesis Alternatif.....	28
BAB III METODE PENELITIAN	29
3.1 Desain Penelitian	29
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	29
3.2.1 Tempat Penelitian	29
3.2.2 Waktu Penelitian.....	29
3.3 Identifikasi Variabel.....	29
3.3.1 Variabel Bebas.....	30
3.3.2 Variabel Terikat	30
3.4 Definisi Operasional	30
3.5 Besar Sampel	31
3.6 Prosedur Penelitian	32

3.6.1	Alat Penelitian.....	32
3.6.2	Bahan Penelitian	32
3.6.3	Determinasi Tanaman	33
3.6.4	Pembuatan Ekstrak	33
3.6.5	Uji Fitokimia.....	34
3.6.5.1	Uji Alkaloid.....	34
3.6.5.2	Uji Flavonoid.....	34
3.6.5.3	Uji Saponin.....	34
3.6.5.4	Uji Tanin.....	34
3.6.5.5	Uji Steroid dan Terpenoid	35
3.6.6	Pengenceran Ekstrak.....	35
3.6.7	Uji Aktivitas Antibakteri	36
3.6.7.1	Sterilisasi Alat	36
3.6.7.2	Identifikasi Bakteri.....	38
3.6.7.3	Pembuatan Media Nutrien Agar	38
3.6.7.4	Peremajaan Bakteri.....	38
3.6.7.5	Pembuatan Larutan Mc. Farland	38
3.6.7.6	Pembuatan Suspensi Bakteri	38
3.6.7.7	Pengujian Aktivitas Antibakteri	39
3.7	Alur Penelitian	40
3.8	Pengolahan dan Analisis Data	41
3.8.1	Analisis Univariat	41
3.8.2	Analisis Bivariat	41
3.9	Etika Penelitian	42
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
4.1	Hasil Penelitian	43
4.1.1	Hasil Determinasi Tanaman	43
4.1.2	Ekstraksi	44

4.1.3 Hasil Uji Fitokimia	45
4.1.4 Hasil Identifikasi Batkeri.....	46
4.1.5 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri.....	47
4.1.6 Hasil Analisis Univariat.....	48
4.1.7 Hasil Analisis Bivariat.....	49
4.2 Pembahasan.....	51
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	58
DAFTAR PUSTAKA	60

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Jenis-Jenis Pelarut	12
Tabel 3.1 Definisi Operasional	30
Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan	32
Tabel 4.1 Hasil Rendemen Ekstrak Metanol Daun Belimbing Manis	45
Tabel 4.2 Hasil Uji Fitokimia Esktrak Metanol Daun Belimbing Manis	45
Tabel 4.3 Hasil Uji Identifikasi Bakteri <i>Streptococcus pyogenes</i>	47
Tabel 4.4 Hasil Diameter Zona Hambat Ekstrak Metanol Daun Belimbing Manis ..	47
Tabel 4.5 Hasil Analisis Univariat Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Manis Terhadap <i>Streptococcus Pyogenes</i>	49
Tabel 4.6 Hasil Uji Normalitas Dan Homogenitas Aktivitas Antibakteri Daun Belimbing Manis Terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i>	54
Tabel 4.7 Hasil uji <i>Kruskal-Wallis</i> Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Manis Terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i>	50
Tabel 4.8 Hasil uji <i>Mann Whitney</i> Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Manis Terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i>	52
Tabel 4.9 Kategori Respon Hambat Pertumbuhan Bakteri	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Belimbing Manis (<i>Averrhoa carambola</i> L)	7
Gambar 2.2 Prinsip Kavitasi Akustik.....	17
Gambar 2.3 Gelembung Kavitasi terhadap Tanaman	17
Gambar 2.4 Ultrasonic bath dan Probe-type ultrasound	18
Gambar 2.5 <i>Streptococcus pyogenes</i>	22
Gambar 2.6 Metode Dilusi	24
Gambar 2.7 Metode Difusi Agar Sumuran	25
Gambar 2.8 Metode Difusi Agar Cakram	26
Gambar 2.9 Metode Difusi Agar Silinder	26
Gambar 2.10 Kerangka Teori	27
Gambar 2.11 Kerangka Konsep	28
Gambar 3.12 Alur Penelitian.....	40
Gambar 4.1 Hasil Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Belimbing Manis Terhadap Pertumbuhan <i>Streptococcus pyogenes</i>	48

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kulit dan subkutan merupakan salah satu jenis penyakit yang banyak terjadi di dunia. Penyakit kulit dan subkutan bertanggung jawab atas 41,6 juta *Disability Adjusted Life Years* (DALYs). Pada tahun 2013 penyakit kulit dan subkutan ditetapkan sebagai penyebab utama ke-18 DALYs global. Penyakit kulit dianggap sebagai penyebab utama keempat kecacatan di seluruh dunia (Karimkhani dkk., 2017). Infeksi kulit yang disebabkan oleh mikroorganisme seperti bakteri, virus dan jamur menyebabkan morbiditas dan menurunkan kualitas hidup pasien dan bahkan tidak jarang menyebabkan infeksi serius dan mengancam jiwa (Craft, 2022). Kondisi tersebut dapat menyebabkan beban kesehatan baik pada negara maju maupun berkembang karena mempengaruhi masyarakat dari segala usia yang berdampak pada kesejahteraan sosial, fisik, dan emosional pasien (Dessie dkk., 2022).

Staphylococcus aureus dan Group A *Streptococcus β-hemolyticus* (*Streptococcus pyogenes*) termasuk dalam bakteri penyebab infeksi kulit tersering (Craft, 2022). *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri gram-positif yang termasuk dalam salah satu flora normal pada kulit manusia. Dalam keadaan tertentu flora normal yang bersifat tidak patogen dapat berubah menjadi patogen dan menimbulkan infeksi (Jawetz dkk., 2019). *Streptococcus pyogenes* sebagai patogen pada manusia dapat menimbulkan berbagai penyakit invasif dan non invasif seperti impetigo, faringitis akut, selulitisme, dan fasciitis nekrotikan. *Fasciitis nekrotikan* merupakan infeksi kulit dan jaringan lunak yang agresif, ditandai oleh kerusakan jaringan fulminan dan progresi penyakit yang cepat (Lannes-Costa

dkk., 2021). Faringitis dan impetigo menyebabkan dampak yang kurang terlihat tetapi berdampak penting dalam pelayanan kesehatan dan penggunaan antibiotik (Oslowicki dkk., 2019).

Peningkatan resistensi antibiotik pada bakteri grup A *Streptococcus* (GAS) dianggap sebagai penyebab utama kematian terkait infeksi (Oslowicki dkk., 2019). Berdasarkan literatur ditemukan bahwa bakteri *Streptococcus pyogenes* resisten terhadap penisilin karena penggunaan yang tidak sesuai (Ferretti dkk., 2017). Mekanisme terjadinya resistensi dapat berupa tidak terdapatnya beberapa reseptor penisilin (*penicillin binding protein*; PBP) dan terjadi akibat dari mutasi kromosom, mekanisme lainnya yaitu berhubungan dengan peningkatan sintesis dinding sel dan juga perubahan dinding sel (Jawetz dkk., 2019). Penisilin digunakan sebagai pilihan utama untuk infeksi *Streptococcus pyogenes* dengan alternatif antibiotik golongan makrolida seperti eritromisin untuk pasien yang alergi dengan penisilin. Peningkatan penggunaan makrolida dalam pengobatan infeksi *Streptococcus pyogenes* menyebabkan peningkatan resistensi bakteri (Ferretti dkk., 2017). Resistensi bakteri semakin meluas sehingga perlu penanganan yang tepat (Yunita & Nursanty, 2019).

Penggunaan bahan kimia seperti antibiotik dalam jangka waktu yang panjang selain menimbulkan resistensi dapat juga menimbulkan kerusakan organ maupun imunohipersensitivitas (Qomar dkk., 2018). Resistensi bakteri yang terus menerus terjadi dapat menimbulkan masalah jika tidak segera ditangani, sehingga diperlukan alternatif sumber antibakteri. Alternatif sumber antibakteri bisa didapatkan dari tanaman alam karena tanaman alam memiliki senyawa sekunder yang berkhasiat. Gaya hidup kembali ke alam (*back to nature*) sekarang sangat diminati dan menjadi tren baru sehingga mempengaruhi penggunaan tanaman alam dan membuat banyak orang mulai menggunakan kembali bahan alam untuk pengobatan (Pertiwi dkk., 2016).

Salah satu tanaman yang berpotensi digunakan untuk pengobatan dengan bahan alam yaitu belimbing manis. Belimbing manis atau yang memiliki nama ilmiah *Averrhoa carambola* L merupakan salah satu tanaman yang berasal dari Asia Tenggara khususnya banyak berada di Indonesia dan mampu menghasilkan buah hampir sepanjang tahun (Abtian dkk., 2019). Badan Pusat Statistik (2022) menyatakan bahwa Indonesia memproduksi belimbing hingga 137.450 ton pada tahun 2021. Bagian yang sering dimanfaatkan pada belimbing manis yaitu buah dan daunnya yang memiliki aktivitas antioksidan, anti inflamator, antimikroba, dan antihelminik (Mardhiyah dkk., 2020). Ekstrak etanol daun belimbing manis mengandung karbohidrat, glikosida, steroid, saponin, flavonid, dan tanin yang berpotensi memiliki sifat farmakologis dapat dimanfaatkan sebagai obat teraupetik (Hossain dkk., 2017). Pada penelitian yang dilakukan oleh Hossain dkk (2017) didapatkan bahwa ekstrak etanol daun belimbing manis dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas spp* pada tingkat sedang dengan daya hambat sebesar 8 mm pada konsentrasi ekstrak 500µg/disc dengan metode difusi cakram pada *Streptococcus pyogenes*. Ekstrak daun belimbing manis yang diuji dengan berbagai jenis bakteri menunjukkan hasil bahwa aktivitas antibakteri yang dimiliki ekstrak daun belimbing manis lebih tinggi pada bakteri gram positif dibandingkan bakteri gram negatif. Ekstrak metanol lebih efektif dibandingkan dengan ekstrak dengan pelarut lainnya dalam menginhibisi bakteri gram positif (Luan dkk., 2021).

Penelitian mengenai aktivitas antibakteri belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) masih jarang ditemukan dibandingkan dengan tanaman segenusnya yaitu belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*). Spesies dalam satu genus memiliki afinitas kimia yang sama atau kemampuan membentuk senyawa kimia yang identik dan khas (Syafitri & Ersam, 2016). Penelitian terhadap daun belimbing manis juga masih banyak yang menggunakan metode ekstraksi konvensional. Modifikasi proses ekstraksi perlu dilakukan untuk memperoleh hasil rendemen yang lebih

banyak dan juga untuk meningkatkan keefisienan waktu, biaya, dan tenaga. Salah satu metode ekstraksi modern yang disarankan yaitu metode *Ultrasonic Assisted Extraction* (Adhiksana, 2017). Proses pada metode sonikasi tidak menyebabkan perubahan signifikan terhadap struktur kimia sehingga dapat menghasilkan ekstrak yang lebih baik (Wang & Xu, 2014).

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai uji aktivitas ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* dalam berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* sebagai bahan alternatif antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka didapatkan rumusan masalah yaitu bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka didapatkan tujuan penelitian ini sebagai berikut :

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui potensi ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* sebagai alternatif antibakteri *Streptococcus pyogenes*.

1.3.2 Tujuan Khusus

- Untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction*.
- Untuk mengetahui diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* pada ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan keilmuan bagi peneliti, meningkatkan kemampuan peneliti dalam menganalisis masalah dan sebagai wujud disiplin ilmu dari pengetahuan yang telah dipelajari peneliti.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sumber informasi untuk masyarakat mengenai potensi aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction*

1.4.3 Bagi Institusi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan pustaka bagi penelitian yang serupa dan menambah publikasi bagi institusi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Belimbing Manis

2.1.1 Klasifikasi

Belimbing manis termasuk kedalam famili *Oxalidaceae* yang memiliki lebih dari 900 spesies dalam 7 genus, seperti *Dapania*, *Oxalis*, *Sarcotheca*, *Eichleria*, *Biophytum*, *Hypseocharis*, dan *Averrhoa*. Genus *Averrhoa* umumnya memiliki tiga spesies yaitu *Averrhoa carambola*, *Averrhoa blimbi*, dan *Averrhoa dolichocarpa* (Luan dkk., 2021).

Berikut klasifikasi belimbing manis (Dasgupta dkk., 2013).

Kingdom : *Plantae*
Subkingdom : *Tracheobionta*
Superdivisi : *Spermatophyta*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Subclass : *Rosidae*
Ordo : *Geraniales*
Famili : *Oxalidaceae*
Genus : *Averrhoa*
Spesies : *Averrhoa carambola* L



Gambar 2.1 Belimbing Manis (*Averrhoa carambola* L.) (Mazza, 2022)

2.1.2 Karakteristik

Belimbing manis dipercaya berasal dari Sri Langka dan Maluku tetapi sekarang sudah banyak dibudidayakan di Asia Tenggara selama ratusan tahun. *Averrhoa carambola* L berukuran kecil, tumbuh sebagai pohon batang pendek dengan tinggi 5-7 meter. Morfologi belimbing manis terdiri dari beberapa bagian seperti akar, batang, daun, buah dan bunga. Daun belimbing manis merupakan daun majemuk menyirip ganjil dengan panjang 3-7 cm meruncing di puncak, berbentuk bulat atau elips berwarna hijau sedang, tekstur halus dipermukaan atas dan keputihan dibagian bawah. Batang belimbing manis berupa kulit kayu keabu-abuan (Luan dkk., 2021). Bunga belimbing manis berwarna ungu terang dan terletak di ketiak daun, bunganya melekat pada pohon dengan batang warna merah, memiliki 5 kelopak dan daun mahkota. Buah belimbing berwarna hijau saat masih belum matang dan berubah menjadi warna kuning setelah matang dengan panjang 15 cm dan lebar 9 cm (Dasgupta dkk., 2013).

2.1.3 Kandungan dan Manfaat Belimbing Manis

Komponen nutrisi seperti mineral, vitamin, selulosa, hemiselulosa, pektin, dan kandungan nutrisi lainnya terkandung dalam *Averrhoa carambola* L.

Dilaporkan bahwa *Averrhoa carambola* L mengandung selulosa (60%), hemiselulosa (27%), dan pektin (13%) yang dapat mengontrol gula darah (Lakmal dkk., 2021). Komponen mineral yang tinggi ditemukan pada *Averrhoa carambola* L berupa potasium (167.13–168.0 mg/100 g buah) fosfor (17.87–17.88 mg/100 g buah), magnesium (11.85–12.05 mg/ 100 g buah), dan kalsium (6.37–6.40 mg/100 g buah). Sedangkan kandungan vitaminnya berupa vitamin C (25.8 mg/100 g buah), dan vitamin B1 and B2 (0.12 mg/100 g buah). Kurang lebih 132 komponen fitokimia telah teridentifikasi pada *Averrhoa carambola* L yaitu berupa flavonoid, alkaloid, terpenoid, fenilpropanoid, steroid, dan saponin sebagai komponen aktif biologis yang bertanggung jawab atas sebagian bioaktivitas yang terjadi. Sejauh ini sudah ada 51 jenis flavonoid yang teridentifikasi menggunakan *nuclear magnetic resonance* (NMR) dan *mass spectrometer* (MS) dari daun, buah, dan akar pada *Averrhoa carambola* L (Luan dkk., 2021).

Adanya aktivitas antibakteri pada daun belimbing manis terjadi karena kandungan senyawa metabolit sekunder yang dimilikinya. Keberadaan suatu senyawa metabolit sekunder dapat menguatkan efek senyawa lainnya sehingga memberikan efek sinergis. Aktivitas antibakteri dari tiap senyawa memiliki mekanisme kerja yang berbeda. Senyawa alkaloid bekerja dengan mekanisme mengganggu sintesis peptidoglikan, sehingga lapisan dinding sel bakteri tak terbentuk secara utuh dan menyebabkan bakteri lisis. Senyawa flavonoid bekerja dengan mekanisme membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga merusak membran sel bakteri. Senyawa steroid bekerja dengan mekanisme mengganggu membran sel bakteri khususnya dibagian lipofilik. Saponin juga bersifat toksik dan dapat mengganggu kestabilan dinding sel bakteri khususnya bakteri golongan gram positif (Yunita & Nursanty, 2019).

Belimbing manis telah dimanfaatkan secara tradisional selama ribuan tahun untuk mengobati diabetes, artralgia, muntah, batuk dan sakit kepala (Luan dkk., 2021). Secara tradisional daun belimbing manis yang dihancurkan dapat digunakan untuk pengobatan cacar air dan kurap, rebusan daun digunakan untuk meredakan stomatitis aftosa dan angina. Selain itu daun belimbing manis digunakan juga untuk mengobati oliguria, bisul, pioderma (Dasgupta dkk., 2013). Daun belimbing manis digunakan sebagai antipruritus, antipiretik dan anthelmintik, selain itu daun belimbing manis dilaporkan dapat mengobati *scabies* (Hossain dkk., 2017).

2.2 Simplisia

2.2.1 Pengertian Simplisia

Simplisia merupakan bahan alam yang sudah dikeringkan yang digunakan sebagai pengobatan dan belum melewati tahap pengolahan. Pengeringan dilakukan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari, diangin-angin, dan menggunakan oven kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan menggunakan oven tidak lebih dari 60⁰C (Departemen Kesehatan, 2017). Simplisia terbagi dalam beberapa jenis yaitu simplisia nabati, simplisia hewani, dan simplisia mineral. Simplisia nabati berasal dari seluruh bagian tumbuhan atau dari bagian tertentu saja seperti akar, kulit akar, batang, kulit batang, daun, bagian bunga. Simplisia yang didapat dari hasil produk pertanian ataupun pengumpulan tumbuhan liar (*wild crop*) memiliki kandungan kimia yang tidak dapat dijamin selalu konstan karena adanya perbedaan variabel bibit, iklim, kondisi panen, pasca panen dan preparasi akhir. Walaupun demikian variabel tersebut dianggap tidak memiliki pengaruh besar terhadap mutu ekstrak nantinya (Endarini, 2016).

2.2.2 Proses Pembuatan Simplisia

Tahapan pembuatan simplisia pada umumnya berupa pengumpulan simplisia, sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, pengepakan dan penyimpanan (Wahyuni dkk., 2014).

1) Pengumpulan simplisia

Kadar senyawa aktif pada simplisia bergantung dengan bagian tanaman yang digunakan, umur tanaman, lingkungan tempat tumbuh, dan waktu panen. Waktu panen tanaman berhubungan dengan pembentukan senyawa aktif pada bagian tanaman yang akan dipanen. Senyawa aktif banyak terkandung dalam tanaman saat waktu panennya tepat.

2) Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran maupun benda asing pada simplisia dengan membuang bagian yang tidak digunakan.

3) Pencucian

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah maupun pengotor lain yang menempel pada simplisia dengan cara dicuci di air mengalir.

4) Perajangan

Perajangan dilakukan dengan pisau atau alat perajang khusus agar diperoleh potongan dengan ukuran yang dikehendaki untuk mempermudah proses pengeringan.

5) Pengeringan

Pengeringan dilakukan agar simplisia tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Pengeringan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik sehingga dapat mencegah kerusakan simplisia. Pengeringan dapat dilakukan dengan cara diangin-anginkan, terpapar sinar matahari langsung, dan

menggunakan oven. Suhu terbaik pengeringan ialah tidak melebihi 60°C.

6) Sortasi kering

Sortasi kering bertujuan untuk memisahkan pengotor yang masih tertinggal pada simplisia kering setelah pengeringan. Tahapan ini dapat dilakukan secara manual dan dilakukan sebelum pengepakan simplisia.

7) Pengepakan dan penyimpanan

Simplisia harus disimpan secara tepat untuk menghindari kerusakan mutu. Simplisia dapat rusak karena beberapa faktor seperti cahaya, reaksi enzimatik dehidrasi, penyerapan air, pengotor, dan serangga. Penyimpanan simplisia kering biasanya pada suhu 15°C sampai 30°C.

2.3 Ekstraksi

2.3.1 Pengertian Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan kandungan aktif dari simplisia menggunakan cairan penyari yang cocok. Senyawa aktif berada dalam jaringan dan sel tanaman bersama dengan senyawa lainnya sehingga untuk mendapatkan senyawa tersebut menggunakan metode ekstraksi. Hasil ekstrak yang diperoleh dari metode ekstraksi dapat berupa cairan tidak murni, semisolid ataupun serbuk (Endarini, 2016). Ekstrak merupakan sediaan kering, kental dan cair yang dibuat dengan menyari simplisia menggunakan metode yang sesuai, di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Departemen Kesehatan, 2017).

Mekanisme ekstraksi pada bahan alam memiliki beberapa tahap berupa :

1. Pelarut melakukan penetrasi kedalam matriks padat
2. Zat terlarut akan terlarut dalam pelarut
3. Zat terlarut akan terdifusi keluar dari matriks padat

4. Zat terlarut bergabung menjadi suatu ekstrak (Zhang dkk., 2018).

Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi berupa :

1. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi

Pemilihan pelarut sangat penting dalam ekstraksi. Hal yang perlu diperhatikan yaitu selektivitas, solubilitas, harga dan keamanannya. Berdasarkan hukum *like dissolves like* maka senyawa polar akan larut dalam senyawa polar begitupun sebaliknya. Alkohol seperti etanol (EtOH) dan metanol (MeOH) merupakan pelarut universal yang sering digunakan untuk ekstraksi pada skrining fitokimia (Zhang dkk., 2018).

Tabel 2.1 Jenis-Jenis Pelarut

Pelarut Polar	Pelarut Non Polar
Air	Kloroform
-Pelarut paling polar yang sering digunakan untuk ekstraksi komponen polar. -Keuntungannya dapat melarutkan berbagai komponen, murah, tidak beracun, tidak mudah terbakar. -Kelemahannya mikroba dapat dengan mudah tumbuh, menyebabkan hidrolisis.	-Pelarut nonpolar yang digunakan untuk mengekstraksi komponen seperti terpenoid, flavonoid, lemak, dan minyak. -Keuntungannya tidak berwarna, wanginya manis, larut dalam alkohol dan mudah terabsorpsi serta termetabolisme dalam tubuh. -Kelemahannya memiliki efek sedatif dan bersifat karsinogenik.

Alkohol

-Bersifat polar, dapat bercampur dengan air, dan dapat mengikat metabolisme sekunder yang bersifat polar.

-Keuntungannya dapat bersifat sebagai *preservative* pada konsentrasi diatas 20%, tidak beracun pada konsentrasi rendah, dan butuh sedikit pemanasan untuk mengkonsentrasikan ekstrak.

-Kelemahannya alkohol tidak dapat melarutkan lemak, mudah terbakar, dan mudah menguap

Eter

-Pelarut nonpolar yang digunakan untuk mengekstraksi komponen seperti alkaloid, terpenoid, kumarin, dan asam lemak.

-Keuntungannya dapat bercampur dengan air, titik didihnya rendah, tidak berasa, dan merupakan komponen yang stabil (Abubakar & Mainul, 2020).

2. Ukuran partikel bahan baku

Umumnya ukuran partikel yang kecil dapat memberikan hasil ekstraksi yang baik. Efisiensi ekstraksi terjadi karena peningkatan penetrasi pelarut dan difusi zat terlarut pada partikel yang berukuran kecil (Zhang dkk., 2018).

3. Perbandingan jumlah pelarut dan bahan baku

Rasio jumlah pelarut dengan bahan baku yang besar akan meningkatkan hasil ekstraksi. Meskipun begitu, rasio pelarut dengan bahan baku yang terlalu tinggi akan menyebabkan ekstraksi pelarut yang berlebihan dan meningkatkan durasi pemekatan (Zhang dkk., 2018).

4. Suhu ekstraksi

Suhu tinggi dapat meningkatkan kelarutan dan difusi pada ekstraksi. Tetapi, pelarut yang suhunya terlalu tinggi dapat menyebabkan dekomposisi komponen termolabil dan ekstrak kotor yang tidak diinginkan (Zhang dkk., 2018).

5. Durasi ekstraksi

Efisiensi ekstraksi meningkat sejalan dengan durasi ekstraksi pada rentang waktu tertentu yaitu saat sebelum terjadi kesetimbangan. Setelah terjadi kesetimbangan, maka peningkatan durasi tidak akan berpengaruh. Sebaiknya, setelah terjadi keseimbangan maka pelarut diganti dengan yang baru karena proses difusi tidak dapat terjadi lagi (Zhang dkk., 2018).

2.3.2 Metode ekstraksi

Pemilihan metode ekstraksi bergantung dengan bagian tanaman yang ingin diekstraksi dan bahan aktif yang diinginkan. Metode ekstraksi yang ideal yaitu metode yang dapat mengekstraksi bahan aktif yang diinginkan sebanyak mungkin, mudah dilakukan, cepat, ramah lingkungan, dan hasil yang diperoleh selalu konsisten (Julianto, 2018). Secara umum metode ekstraksi dibagi menjadi dua, yaitu metode konvensional dan *modern*. Metode ekstraksi konvensional diantaranya maserasi, perkolasi, dan sokletasi sedangkan metode ekstraksi *modern* diantaranya *ultrasound-assisted extraction (UAE)*, *supercritical fluid extraction (SFE)*, dan *microwave-assisted extraction (MAE)* (Zhang dkk., 2018).

a. Maserasi

Metode maserasi merupakan metode yang sederhana dan sangat cocok digunakan untuk ekstraksi senyawa yang tidak tahan panas (termolabil) (Zhang dkk., 2018). Pada metode maserasi, bubuk kasar sampel tanaman direndam dalam pelarut di wadah tertutup pada suhu kamar

dengan waktu tertentu sekurang-kurangnya tiga hari disertai pengadukan sehari sekali hingga komponen sampel tanaman terlarut (Julianto, 2018). Pelarut yang biasa digunakan pada maserasi yaitu alkohol. Campuran pada metode maserasi disaring dan ampasnya diperas untuk diambil bagian cairnya saja. Setelah proses ekstraksi selesai maka cairan yang diperoleh dijernihkan dengan penyaringan menggunakan *rotary evaporator* kemudian dilanjutkan dengan penguapan di atas *water bath* (Abubakar & Mainul, 2020).

Keuntungan metode maserasi yaitu bagian tanaman yang akan diekstrak tidak harus dalam bentuk serbuk halus dan tidak diperlukan keahlian khusus sedangkan kelemahannya yaitu harus dilakukan pengadukan, penyaringan dan terjadi residu pelarut dalam ampas (Endarini, 2016).

b. Sokletasi

Metode sokletasi atau yang disebut juga dengan *continuous hot extraction* digunakan ketika senyawa yang diinginkan memiliki kelarutan terbatas dan pengotor tidak larut dalam pelarut tersebut (Julianto, 2018). Sampel tanaman dimasukkan kedalam kantong berpori (*thimble*) dan dimasukkan kedalam alat soklet untuk dilakukan ekstraksi. Pelarut pada labu dipanaskan dan uapnya akan mengembun pada kondensor. Embun tersebut akan turun menuju kantong berpori berisi tanaman yang akan diekstrak sehingga kontak antar embunan pelarut dengan tanaman membuat bahan aktif terekstraksi. Ketika ketinggian cairan dalam tempat ekstraksi meningkat sampai puncak kapiler maka cairan dalam tempat ekstraksi akan mengalir ke labu. Proses ini berlangsung secara terus menerus (kontinyu) hingga tetesan pelarut dari pipa kapiler tidak lagi meninggalkan residu ketika menguap (Endarini, 2016).

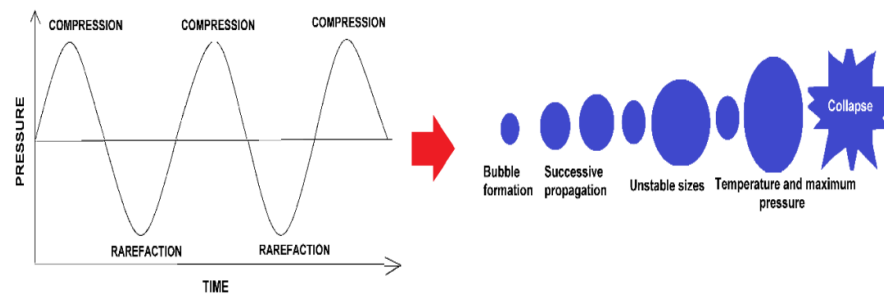
Keuntungan metode sokletasi yaitu metode ini dapat mengekstrak bahan aktif lebih banyak walaupun menggunakan pelarut yang sedikit, selain itu karena proses kontinyu sampel tanaman terus berkontak dengan pelarut segar yang turun dari kondensor sehingga selalu mengubah kesetimbangan dan mempercepat perpindahan massa bahan aktif sedangkan kelemahannya yaitu karena sampel diekstrak pada titik didih pelarut dalam jangka waktu yang cukup lama, maka bahan aktif yang tidak tahan panas (termolabil) dapat mengalami dekomposisi dan juga tidak dapat dilakukan pengadukan untuk mempercepat proses ekstraksi (Abubakar & Mainul, 2020).

c. *Ultrasound-assisted extraction (UAE)*

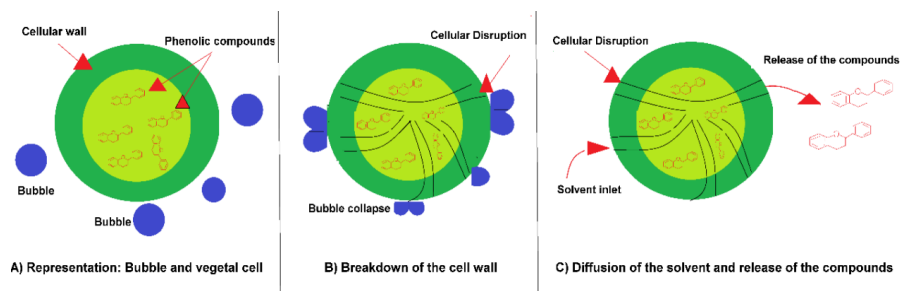
Ultrasound-assisted extraction (UAE) atau yang biasa disebut dengan sonikasi merupakan teknik ekstraksi modern yang dapat mengekstraksi sejumlah besar senyawa bioaktif dalam waktu yang lebih singkat dengan menggunakan gelombang energi ultrasonik (Julianto, 2018). Pada metode ini sampel bahan tanaman harus kering, berbentuk serbuk halus, dan disaring dengan benar. Sampel yang sudah disiapkan kemudian dicampur dengan pelarut untuk ekstraksi yang sesuai dan dimasukkan dalam alat ultrasonik (Abubakar & Mainul, 2020).

Ultrasound-assisted extraction memanfaatkan fenomena kimia dan fisika secara fundamental dibandingkan dengan teknik ekstraksi konvensional lainnya (Chemat dkk., 2017). *Ultrasound-assisted extraction* melibatkan energi suara dengan frekuensi sangat tinggi yaitu diatas 20 kHz yang dapat meningkatkan penetrasi pelarut kedalam matriks karena gangguan dinding sel yang dihasilkan oleh kavitasi akustik (Zhang dkk., 2018). Selama proses *ultrasound-assisted extraction* kavitasi akustik memproduksi gelombang kavitasi yang terbentuk pada energi tinggi dan meningkatkan gaya tarik menarik

molekul cairan sehingga gelembung menempel pada permukaan partikel dan mengarahkan partikel ke pusat iradiasi ultrasonik sehingga terjadi kerusakan dinding sel. Selain itu, *ultrasound-assisted extraction* juga menggunakan efek mekanis yang mendorong penetrasi pelarut yang lebih baik ke dalam matriks sampel sehingga memungkinkan tingkat difusi yang lebih tinggi saat melintasi dinding sel (Syahrir dkk., 2020).

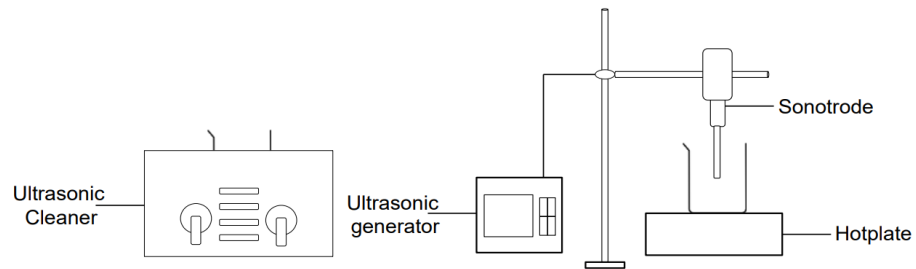


Gambar 2.2 Prinsip Kavitasi Akustik (Torres dkk., 2017).



Gambar 2.3 Gelembung Kavitasi terhadap Tanaman (Torres dkk., 2017).

Ultrasonic Assisted Extraction (UAE) dibagi menjadi dua jenis yaitu *Ultrasonic Bath* dan *Probe Type Ultrasound*. Kedua jenis ini berdasarkan pada transduser sebagai sumber kekuatan ultrasonik. Transduser piezoelektrik merupakan jenis transduser yang paling umum digunakan sebagai reaktor ultrasonik. *Ultrasonic Bath* yang lebih umum dan sering digunakan terdiri dari tangki *stainless steel* dengan satu atau lebih transduser ultrasonik. *Ultrasonic Bath* biasa beroperasi pada frekuensi sekitar 40kHz dengan pengaturan suhu (Chemat dkk., 2017).



Gambar 2.4 *Ultrasonic Bath dan Probe Type Ultrasound* (Sukor dkk., 2018).

Keuntungan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* yaitu metode ini dapat menghasilkan ekstrak yang lebih bersih dan bebas sisa pelarut atau kontaminan dan dapat digunakan pada sampel yang sedikit. Metode ini menghemat waktu ekstraksi dan jumlah pelarut yang digunakan. *Ultrasonic Assisted Extraction* cocok digunakan untuk ekstraksi senyawa yang termolabil (Abubakar & Mainul, 2020). Kelemahannya yaitu tingginya jumlah energi yang diterapkan dapat menurunkan kandungan fitokimia dengan menghasilkan radikal bebas dan juga *Ultrasonic Assisted Extraction* membutuhkan langkah penyaringan (Syahrir dkk., 2020).

Parameter yang mempengaruhi *Ultrasonic Assisted Extraction* :

a. Waktu Ekstraksi

Waktu ekstraksi mempengaruhi hasil ekstrak, peningkatan waktu ekstraksi dapat meningkatkan hasil ekstrak karena gelombang ultrasonik memiliki lebih banyak waktu untuk mengganggu dinding sel dan melepaskan isi sel. Namun, pada titik waktu ekstraksi tertentu hasil ekstraksi akan konstan atau menurun karena sudah melewati titik kesetimbangan. Waktu ekstraksi yang terlalu lama dapat meningkatkan peluang dekomposisi sampel dan berpotensi meningkatkan kehilangan pelarut karena penguapan yang terjadi terus menerus sehingga ekstraksi harus dilakukan di waktu puncak yang sesuai (Syahrir dkk., 2020).

b. Temperatur Ekstraksi

Suhu ekstraksi mempengaruhi hasil ekstrak, suhu yang tinggi akan meningkatkan kecepatan gelembung pecah dalam pelarut dan mendorong penetrasi pelarut kedalam jaringan sel dan mempercepat pelepasan isi sel kedalam larutan ekstraksi. Namun suhu yang terlalu tinggi dapat menurunkan kandungan senyawa bioaktif dalam ekstrak. Suhu ekstraksi optimal yang disarankan yaitu antara 30°C - 50°C (Syahrir dkk., 2020).

c. Kekuatan Ultrasonik

Peningkatan kekuatan ultrasonik dalam *ultrasound-assisted extraction* dapat meningkatkan hasil ekstraksi. Gelombang ultrasonik dengan amplitudo yang besar akan merambat melalui pelarut dan menghasilkan lebih banyak gelembung yang meledak dengan kecepatan tinggi sehingga mengganggu dinding sel dan menyebabkan penetrasi pelarut ke dalam sel. Namun, efisiensi ekstraksi akan menurun jika kekuatan ultrasonik melebihi kekuatan ultrasonik optimal (Syahrir dkk., 2020).

2.4 Senyawa Kimia Tanaman

Makhluk hidup memiliki variasi dalam melakukan sintesis dan proses perubahan senyawa kimia. Seluruh perubahan kimia yang terjadi pada sel hidup meliputi pembentukan maupun penguraian senyawa kimia disebut dengan metabolisme. Senyawa kimia dibagi menjadi dua golongan yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder yang merupakan hasil dari metabolisme (Julianto, 2018).

Metabolit primer merupakan senyawa yang terlibat dalam pertumbuhan dan perkembangan suatu tanaman (Julianto, 2018). Metabolit primer terdiri dari polisakarida, protein, lemak dan asam nukleat yang merupakan penyusun utama pada makhluk hidup. Metabolit primer didapat dari proses metabolisme primer

yang merupakan proses sintesis dan perombakan zat yang dilakukan suatu makhluk hidup untuk kelangsungan hidupnya (Endarini, 2016).

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan selain dari jalur metabolisme primer yang disebut dengan metabolisme sekunder. Metabolisme sekunder menghasilkan sejumlah senyawa khusus yang secara fungsional tidak memiliki peran dalam membantu pertumbuhan dan perkembangan tanaman tapi dibutuhkan tanaman tersebut untuk bertahan dari keadaan lingkungannya. Beberapa fungsi penting dari metabolit sekunder ialah sebagai hormon, agen pewarna untuk menarik atau memberi peringatan pada spesies lain, fitoaleksan atau bahan racun sebagai pertahanan melawan predator, dan merangsang sekresi senyawa lain seperti alkaloid, terpenoid, senyawa fenolik, glikosida, gula dan asam amino (Julianto, 2018).

Kandungan golongan senyawa kimia dapat diketahui secara kualitatif dengan melakukan skrining fitokimia. Skrining fitokimia merupakan uji awal yang dilakukan untuk mendeteksi keberadaan senyawa metabolit primer dan juga sekunder dalam suatu ekstrak. Contoh senyawa yang diuji keberadaannya berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, terpenoid, protein, karbohidrat, dan lemak (Abubakar & Mainul, 2020).

2.5 *Streptococcus pyogenes*

2.5.1 Pengertian

Streptococcus merupakan bakteri gram positif yang memiliki bentuk *coccus* atau bulat dengan karakteristik membentuk rantai. Beberapa kelompok *Streptococcus* merupakan flora normal manusia dan yang lainnya sebagai penyebab penyakit infeksi *Streptococcus*. *Streptococcus* termasuk dalam kelompok bakteri heterogen. *Streptococcus* diklasifikasikan menjadi beberapa kategori utama yaitu (1) morfologi koloni dan reaksi hemolitik pada agar darah; (2) spesifisitas serologi

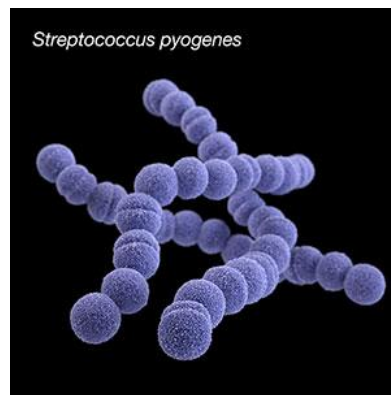
substansi dinding sel grup spesifik (klasifikasi *Lancefield*) dan dinding sel lain atau antigen kapsular;(3) reaksi biokimia dan resistansi terhadap faktor kimia dan fisik; dan (4) gambaran ekologi. *Streptococcus pyogenes* memiliki ciri-ciri dengan kombinasi sifat pertumbuhan koloni, pola hemolisis pada agar darah, komposisi antigenik pada substansi dinding sel grup spesifik, dan reaksi biokimia (Jawetz dkk., 2019).

Streptococcus pyogenes bersifat anaerob fakultatif, tidak memiliki spora, dan termasuk dalam jenis *streptococcus* yang mengandung antigen grup A dan bersifat β hemolitik yang memiliki zona hemolisis besar sekitar 1 cm pada koloni yang berdiameter lebih dari 0,5 mm. Membentuk koloni berukuran kecil sampai medium dan metabolismenya secara fermentasi (Soedarto, 2015). Bersifat PYR-positif dan sensitif terhadap basitrasin. *Streptococcus pyogenes* memiliki habitat di tenggorokan dan kulit (Jawetz dkk., 2019). *Streptococcus pyogenes* sebagai patogen utama pada manusia menyebabkan kurang lebih 600 juta infeksi pertahun. Bakteri ini dapat menginfeksi bagian atas saluran pernapasan dan kulit tanpa gejala. Infeksi oleh *Streptococcus pyogenes* dapat dibagi menjadi tiga bagian yaitu infeksi superfisial (seperti impetigo, faringotonsilitis, dan vaginitis), infeksi dalam (seperti bakteremia, myositis, selulitis, meningitis, dan pneumonia), infeksi yang diperantarai toksin (seperti demam berdarah atau sindrom syok toksik *Streptococcus* (STSS). Lini pertama pengobatan infeksi *Streptococcus pyogenes* yaitu penisilin. Terapi antibakteri menggunakan antibiotik golongan β laktam memang umum terjadi kegagalan terapi, tetapi tidak ada mekanisme resistensi yang dilaporkan hingga saat ini. Melihat dari tidak adanya perubahan konsentrasi hambat minimum pada penisilin dalam kasus alergi atau kegagalan terapi, antibiotik makrolida, linkosamid, dan streptogramin (MLS) dianggap sebagai pilihan alternatif (Ferretti dkk., 2017).

2.5.2 Klasifikasi Bakteri *Streptococcus pyogenes*

Klasifikasi bakteri *Streptococcus pyogenes* menurut *Bergey's Manual of Determinative Biology* (Whiley & Hardie, 2015) sebagai berikut :

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



Gambar 2.5 *Streptococcus pyogenes* (CDC, 2021)

2.6 Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau membunuh bakteri. Senyawa antibakteri memiliki mekanisme kerja diantaranya melalui toksisitas selektif, inhibisi sintesis dan fungsi membran sel, inhibisi sintesis protein, dan inhibisi sintesis asam nukleat (Jawetz dkk., 2019). Antibakteri dapat berasal dari alam maupun sintesis. Antibakteri sintesis yaitu antibiotik merupakan senyawa kimia yang dihasilkan organisme hidup yang

dibuat secara sintetik yang dalam kadar rendah dapat menghambat pertumbuhan atau menyebabkan kematian pada mikroorganisme (Etebu & Ariekpar, 2014).

Aktivitas antimikroba diukur secara *in vitro* untuk menentukan potensi agen antibakteri dalam larutan, konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan, dan kerentanan mikroorganisme tertentu terhadap obat dengan konsentrasi tertentu. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas antimikroba *in vitro* yaitu pH lingkungan karena beberapa obat ada yang lebih aktif pada pH asam maupun sebaliknya, komponen medium, stabilitas obat karena beberapa agen antimikroba kehilangan aktivitasnya pada suhu inkubator, ukuran inokulum karena pada umumnya semakin besar inokulum bakteri maka semakin rendah kerentanan bakteri tersebut, dan lama inkubasi karena semakin lama inkubasi berlangsung maka semakin besar kemungkinan mutan resisten muncul (Jawetz dkk., 2019).

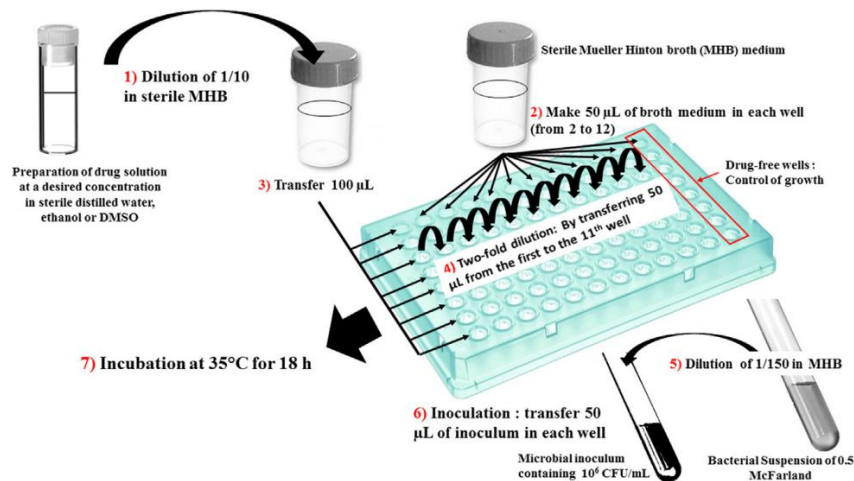
2.7 Metode Pengujian Antibakteri

Penentuan kerentanan patogen bakteri terhadap agen antibakteri dapat dilakukan dengan salah satu metode utama yaitu dilusi dan difusi. Metode ini dapat digunakan untuk memperkirakan potensi antibakteri dalam sampel maupun kerentanan mikroorganisme (Jawetz dkk., 2019).

2.7.1 Metode Dilusi

Metode dilusi adalah metode tepat untuk penentuan nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) karena adanya kemungkinan untuk memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam agar (dilusi agar) atau media kaldu (*macrodilution* atau *microdilution*). Metode dilusi agar maupun kaldu dapat digunakan untuk mengukur secara kuantitatif aktivitas antimikroba *in vitro* terhadap bakteri dan jamur. Nilai MIC yang tercatat didefinisikan sebagai konsentrasi terendah agen antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji dan dinyatakan dalam mg/mL atau mg/L (Balouiri dkk., 2016). Pada metode

dilusi, zat antimikroba dimasukkan kedalam medium bakteriologi dengan pengenceran dua kali lipat zat antimikroba. Kemudian medium diinokulasi dengan bakteri yang akan diuji dan diinkubasi. Tujuan akhirnya yaitu untuk mengetahui seberapa besar jumlah zat antimikroba yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang diuji (Jawetz dkk., 2019).



Gambar 2.6 Metode dilusi (Balouiri dkk., 2016).

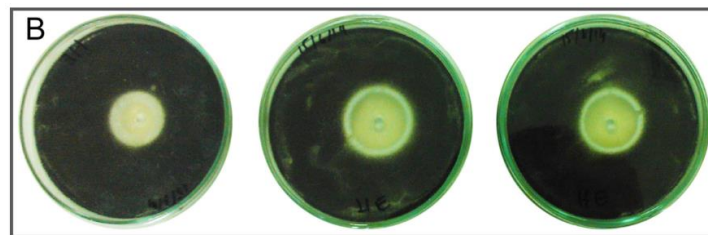
2.7.2 Metode Difusi

Metode difusi dilakukan untuk menentukan sensitivitas mikroba uji terhadap antimikroba dengan prinsip kerja yaitu terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat tempat inokulasi mikroba uji. Hasil yang didapatkan dari metode ini berupa ada atau tidaknya zona atau daerah bening sebagai petunjuk zona hambat pada pertumbuhan bakteri yang terbentuk di sekeliling kertas cakram (Jawetz dkk., 2019). Metode difusi kurang sesuai digunakan untuk menentukan *minimum inhibitory concentration* (MIC) karena tidak memungkinkan untuk mengukur jumlah agen antimikroba yang berdifusi ke dalam media agar. Metode difusi memiliki beberapa keuntungan dibanding dengan metode lainnya berupa pengerjaan mudah, biaya murah, dan hasilnya mudah untuk diinterpretasikan (Balouiri dkk., 2016).

Tiga jenis metode difusi yaitu metode sumuran, cakram, dan silinder

a. Metode sumuran

Metode sumuran banyak digunakan untuk mengetahui aktivitas antimikroba tanaman. Seperti metode difusi lainnya permukaan media agar diinokulasi dengan menyebarkan volume inokulum mikroba ke seluruh permukaan agar. Kemudian, lubang dengan diameter 6 hingga 8 mm dibuat secara aseptik dengan penggerak steril. Antimikroba atau larutan ekstrak dengan konsentrasi yang diinginkan berkisar 20-100 μL dimasukkan ke dalam lubang sumuran. Kemudian, cawan petri berisi agar diinkubasi tergantung pada mikroorganisme uji dalam kondisi yang sesuai. Agen antimikroba berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan strain mikroba uji (Balouiri dkk., 2016).

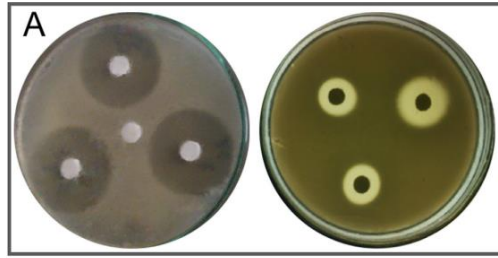


Gambar 2.7 Metode difusi agar sumuran(Balouiri dkk., 2016).

b. Metode cakram

Metode cakram banyak digunakan untuk uji antimikroba pada ekstrak tanaman, *essential oil*, dan obat-obatan. Metode cakram memiliki prinsip kerja yaitu terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat tempat inokulasi mikroba uji menggunakan kertas cakram. Hasil yang didapatkan dari metode ini berupa ada atau tidaknya zona atau daerah bening sebagai petunjuk zona hambat pada pertumbuhan bakteri yang terbentuk di sekeliling kertas cakram (Jawetz dkk., 2019). Media agar diinokulasi dengan inokulum standar mikroorganisme uji. Kemudian, kertas cakram(berdiameter sekitar 6 mm) yang mengandung senyawa uji pada konsentrasi yang diinginkan ditempatkan pada

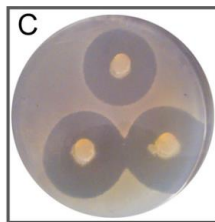
permukaan agar. Cawan Petri diinkubasi dalam kondisi yang sesuai berkisar 18-24 jam dengan suhu 35°C. Umumnya, agen antimikroba berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji sehingga diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dapat diukur (Balouiri dkk., 2016).



Gambar 2.8 Metode difusi agar cakram (Balouiri dkk., 2016).

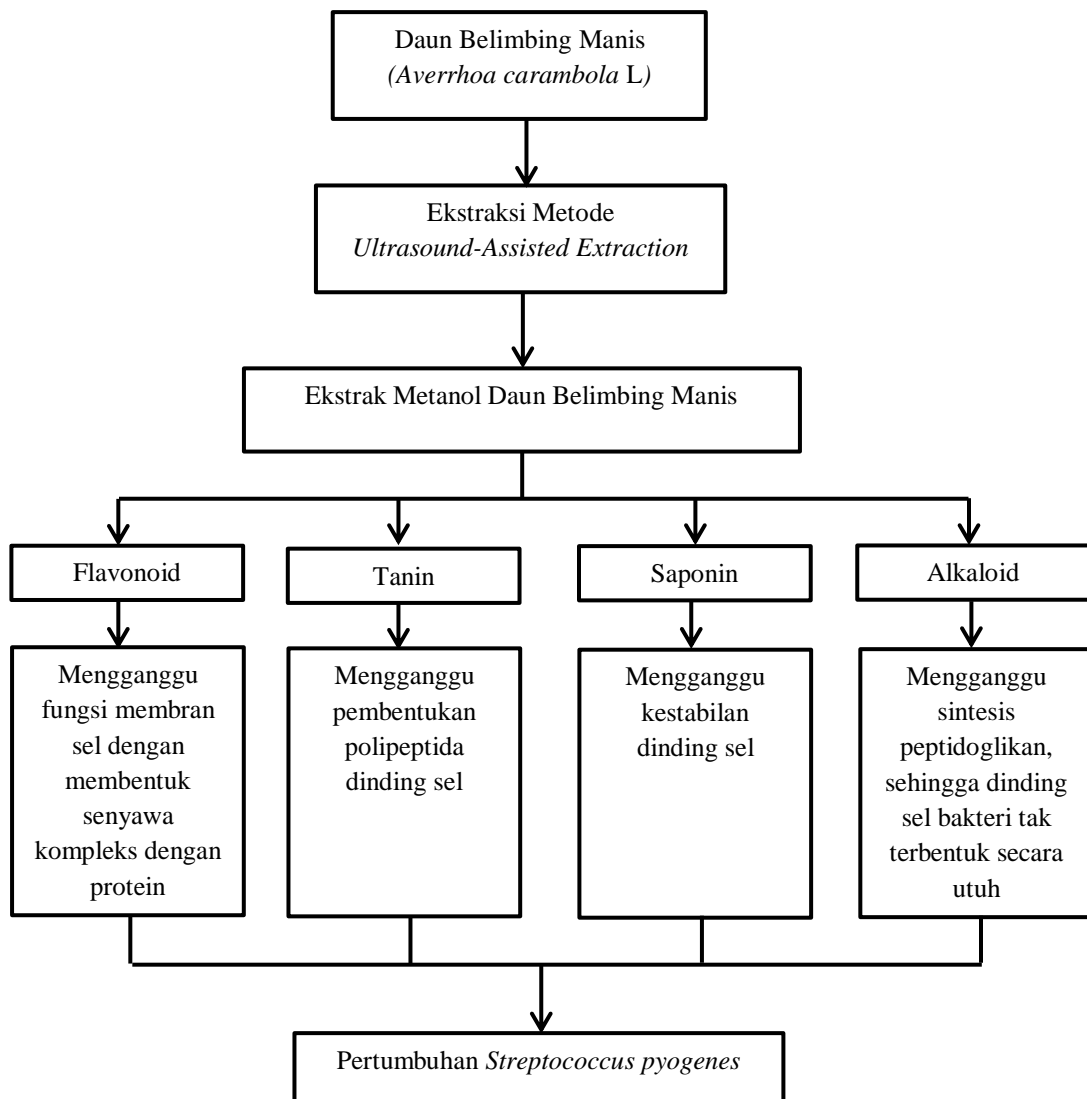
c. Metode silinder

Metode silinder memiliki prosedur yang sama dengan metode cakram. Metode silinder menggunakan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat yang dilekatkan diatas media agar yang telah diinokulasi. Selama pertumbuhan, sel mikroba mengeluarkan molekul yang berdifusi pada media agar. Setelah inkubasi, agar-plot atau silinder dipotong secara aseptis dengan penggerak steril dan diletakan pada permukaan agar yang sebelumnya sudah diinokulasi oleh mikroorganisme uji. Kemudian, aktivitas antimikroba dari molekul yang disekresikan mikroba dideteksi dengan munculnya zona hambat di sekitar silinder agar (Balouiri dkk., 2016).



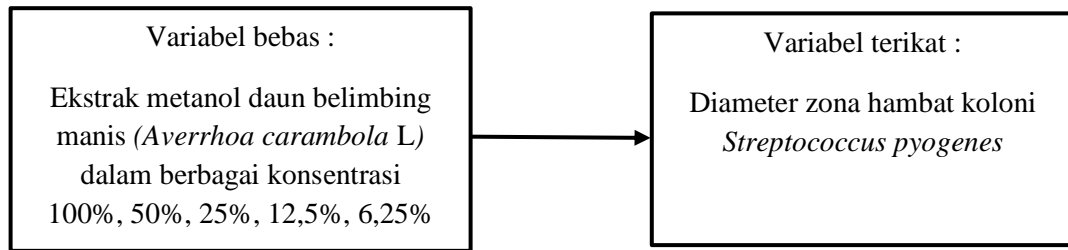
Gambar 2.9 Metode difusi agar silinder (Balouiri dkk., 2016).

2.8 Kerangka Teori



Gambar 2.10 Kerangka Teori

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 2.11 Kerangka Konsep

2.10 Hipotesis

2.10.1 Hipotesis Null (H₀)

Ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction*) tidak memiliki aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

2.10.2 Hipotesis Alternatif (H_a)

Ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) yang diekstraksi menggunakan metode *Ultrasonic Assisted Extraction* memiliki aktivitas antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan percobaan *post-test only control group design* untuk menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* menggunakan metode sumuran dan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung untuk mendeterminasi jenis tanaman, Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk melakukan uji skrining fitokimia dan pembuatan ekstraksi, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung untuk uji aktivitas antibakteri.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan November 2022 sampai Maret 2023.

3.3 Identifikasi Variabel

Pada penelitian ini terdapat dua bagian variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat.

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang masuk pada penelitian ini yaitu ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, dan 6.25%, kontrol positif amoksisilin 2%, dan kontrol negatif aquades

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang masuk dalam penelitian ini yaitu diameter zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

3.4 Definisi Operasional

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala
Variabel Bebas: Ekstrak metanol daun belimbing manis (<i>Averrhoa carambola</i> L) 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%, K(+) Amoksisilin 2% K(-) Aquades	Suatu zat yang diperoleh dari ekstraksi daun belimbing manis menggunakan pelarut metanol. Kemudian ekstrak metanol dengan volume tertentu akan diencerkan dengan aquades hingga konsentrasi menjadi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25% (Departemen Kesehatan, 2017).	Menggunakan persamaan : $N1 \times V1 = N2 \times V2$ N1=Konsentrasi awal N2=Konsentrasi akhir V1=Volume awal V2=Volume akhir	Ekstrak metanol daun belimbing manis (<i>Averrhoa carambola</i> L) 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%, K(+) Amoksisilin 2% K(-) Aquades	Ordinal
Variabel Terikat: Diameter zona hambat <i>Streptococcus pyogenes</i>	Diameter terluar daerah bening di sekitar sumuran yang berisi ekstrak metanol daun belimbing manis yang menandakan tidak adanya pertumbuhan <i>Streptococcus pyogenes</i> (Hossain dkk., 2017).	Mengukur diameter terluar zona bening di sekitar sumuran.	Milimeter (mm) ≤ 5 mm: Lemah 6-10 mm : Sedang 11-20 mm : Kuat ≥ 21 mm : Sangat kuat	Ordinal

3.5 Besar Sampel

Pada penelitian ini sampel yang diuji yaitu ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25% serta kontrol positif yaitu antibiotik amoksisilin dan kontrol negatif yaitu aquades sebagai pembanding. Penentuan sampel ditentukan sesuai dengan tujuan penelitian (Sastroasmoro, 2014).

Untuk menentukan banyak pengulangan perlakuan dapat digunakan rumus Federer :

$$(n-1)(k-1) \geq 15$$

Keterangan :

n = banyak pengulangan perlakuan

k = banyak sampel

$$(n-1)(k-1) \geq 15$$

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

$$(n-1)6 \geq 15$$

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Hasil dari perhitungan menggunakan rumus federer didapatkan bahwa banyaknya pengulangan perlakuan (n) sebesar 3,5 dan dibulatkan menjadi 4. Hal ini menandakan bahwa pada masing-masing konsentrasi ekstrak metanol daun belimbing manis, kontrol positif, dan kontrol negatif akan dilakukan sebanyak 4 kali percobaan dengan jumlah kelompok perlakuan sejumlah 7 kelompok sehingga jumlah seluruh subjek penelitian adalah 28 sampel.

Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
K(+)	Kelompok yang diberikan amoksisilin sebagai kontrol (+)
K(-)	Kelompok yang diberikan aquades sebagai kontrol (-)
PE1	Kelompok yang diberikan ekstrak metanol daun belimbing manis dengan konsentrasi 6,25%
PE2	Kelompok yang diberikan ekstrak metanol daun belimbing manis dengan konsentrasi 12,5%
PE3	Kelompok yang diberikan ekstrak metanol daun belimbing manis dengan konsentrasi 25%
PE4	Kelompok yang diberikan ekstrak metanol daun belimbing manis dengan konsentrasi 50%
PE5	Kelompok yang diberikan ekstrak metanol daun belimbing manis dengan konsentrasi 100%

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian yaitu *chopper*, *mesh* 60, batang pengaduk, timbangan analitik merek OPTICA, *plastic wrap*, *aluminium foil*, seperangkat alat *rotary* evaporator merek IKA, *ultrasonic cleaning bath* merek BAKU BK-2000, oven merek MEMMERT, gelas *beaker*, *erlenmeyer*, rak dan tabung reaksi merek PYREX, cawan petri, ose, kapas steril, lampu bunsen, pipet tetes, mikropipet, *yellow tip*, jangka sorong, *autoclave*, inkubator merek MEMMERT, masker dan *handscoon*.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu 1.3 kg daun segar belimbing manis (*Averrhoa carambola* L), isolat bakteri *Streptococcus pyogenes*, media Muller Hinton Agar (MHA), larutan standar 0,5 *Mc Farland*, antibiotik amoksisilin, aquadest, metanol 99%, pereaksi Meyer, HCl, FeCl₃, serbuk Mg, H₂SO₄, asam asetat glasial.

3.6.3 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian ini memang merupakan daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L). Determinasi daun belimbing manis dilakukan di Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.6.4 Pembuatan Ekstrak

Daun belimbing manis sebanyak 1.3 kg dibersihkan dan dicuci dengan alir mengalir. Sampel dijemur dibawah sinar matahari dan ditutup dengan kain hitam (Luliana, Purwanti & Manihuruk, 2016). Penjemuran dicukupkan saat daun belimbing manis yang sudah bisa diremah dan mudah hancur Kemudian simplisia yang sudah kering dihancurkan menggunakan choper hingga berbentuk serbuk. Serbuknya disimpan ditempat yang sejuk dan kering (Hossain dkk., 2017). Penelitian ini menggunakan metode yang sudah dilakukan oleh Andriani dkk (2019) dengan terdapat beberapa modifikasi. Sebanyak 20 gram sampel dicampur dengan pelarut metanol 99% sebanyak 200 ml (perbandingan ekstrak dan pelarut 1:10) dimasukan kedalam erlenmeyer yang atasnya ditutup dengan *aluminium foil* kemudian diekstraksi menggunakan *Ultrasonic Cleaning Bath* dengan frekuensi 40 kHz. Ekstraksi diatur pada suhu 40°C dan waktu 20 menit. Ekstraksi terus dilakukan hingga seluruh serbuk habis diekstrak. Setelah didapatkan ekstrak maka dilakukan penyaringan filtrat ekstrak menggunakan kertas saring. Kemudian filtrat yang sudah disaring akan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50⁰C kecepatan 100 rpm hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung rendemen ekstraknya.

3.6.5 Uji Fitokimia

3.6.5.1 Uji Alkaloid

Sejumlah 1mL ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 1mL kalium merkuri iodida (reagen mayer) dan dikocok. Jika terbentuk endapan putih atau ada kekeruhan berarti sampel tersebut positif mengandung alkaloid (Abubakar & Mainul, 2020).

3.6.5.2 Uji Flavonoid

Pada uji flavonoid sebanyak 1 mL ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan serbuk magnesium 0,5gr dan 1mL HCl pekat kemudian dikocok. Jika terdapat perubahan warna merah berarti sampel tersebut positif mengandung flavonoid (Abubakar & Mainul, 2020).

3.6.5.3 Uji Saponin

Pada uji saponin sebanyak 1mL ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1mL aquades kemudian dikocok. Jika terbentuk busa maka dianggap sebagai indikasi terdapat saponin (Abubakar & Mainul, 2020).

3.6.5.4 Uji Tanin

Pada uji tanin sebanyak 1 mL ekstrak dimasukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 tetes FeCl_3 10% kemudian dikocok. Sampel bereaksi positif jika berubah warna menjadi hitam kebiruan (Abubakar & Mainul, 2020)

3.6.5.5 Uji Steroid dan Terpenoid

Pada uji steroid dan terpenoid sebanyak 1 ml ekstrak ditambah 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Perubahan warna menjadi biru menandakan bahwa sampel positif mengandung steroid dan perubahan warna menjadi merah menandakan bahwa sampel positif mengandung terpenoid (Abubakar & Mainul, 2020).

3.6.6 Pengenceran Ekstrak

Ekstrak metanol daun belimbing manis dengan konsentrasi 100% dibuat dengan menimbang sebanyak 10gr ekstrak dan dilarutkan dalam aquades 10 ml, kemudian dari ekstrak 100% diencerkan menjadi beberapa konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25% Pengenceran dilakukan dengan rumus :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

N_1 = Konsentrasi awal

V_1 = Volume awal

N_2 = Konsentrasi yang diinginkan

V_2 = Volume yang diinginkan

1. Ekstrak dengan konsentrasi 50%

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$100\% \times V_1 = 50\% \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = \frac{50\% \times 10\text{ml}}{100\%}$$

$$V_1 = 5\text{ml}$$

(5 ml ekstrak dan 5 ml aquades)

2. Ekstrak dengan konsentrasi 25%

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$100\% \times V_1 = 25\% \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = \frac{25\% \times 10\text{ml}}{100\%}$$

$$V_1 = 2,5\text{ml}$$

(2,5 ml ekstrak dan 7,5 ml aquades)

3. Ekstrak dengan konsentrasi 12,5%

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$100\% \times V_1 = 12,5\% \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = \frac{12,5\% \times 10\text{ml}}{100\%}$$

$$V_1 = 1,25\text{ml}$$

(1,25 ml ekstrak dan 8,75 ml aquades)

4. Ekstrak dengan konsentrasi 6,25%

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$100\% \times V_1 = 6,25\% \times 10\text{ml}$$

$$V_1 = \frac{6,25\% \times 10\text{ml}}{100\%}$$

$$V_1 = 0,625\text{ml}$$

(0,625 ml ekstrak dan 9,375 ml aquades)

3.6.7 Uji Aktivitas Antibakteri

3.6.7.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi dilakukan dengan tujuan untuk menghindari terjadinya pertumbuhan dan pencemaran dari mikroorganisme lain yang dapat mengganggu penelitian. Sterilisasi dilakukan sebelum memulai prosedur dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15-20 menit. Alat ditunggu hingga kering dan mencapai suhu ruangan. Untuk ose bulat disterilkan

dengan pemijaran langsung pada nyala api bunsen (Azizah dkk., 2020).

3.6.7.2 Identifikasi Bakteri

Pembiakan bakteri *Streptococcus pyogenes* menggunakan Nutrien Agar (NA) yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Isnaeni dkk., 2021). Untuk memastikan bakteri uji maka dilakukan identifikasi bakteri dengan pewarnaan gram dan uji katalase.

Langkah uji pewarnaan gram sebagai berikut :

1. Buat apusan bakteri *Streptococcus pyogenes*.
2. Teteskan pewarna dasar *crystal violet*, dibiarkan kurang lebih 1-2 menit.
3. Kelebihan pewarna dasar *crystal violet* dibilas dengan air mengalir secara hati-hati.
4. Preparat apus dibilas kembali dengan iodine, dibiarkan kurang lebih 1-2 menit.
5. Lakukan dekolorisasi dengan mengalirkan etanol 96% pada apusan dari bagian ujung *object glass*, dibiarkan kurang lebih 1-2 menit. Kemudian dibilas menggunakan air mengalir.
6. Lakukan pewarnaan dengan safranin selama 1 menit sebagai warna pembanding, kemudian dibilas di air mengalir.
7. Amati hasil apusan di bawah mikroskop (Pribadi et al., 2020)

Langkah uji katalase sebagai berikut :

Koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* diambil menggunakan ose steril kemudian digoreskan ke *object glass* dan ditetesi H₂O₂ 3%. Jika tidak terdapat gelembung menandakan bahwa bakteri tidak menghasilkan enzim katalase (Pribadi et al., 2020).

3.6.7.3 Pembuatan Media Nutrien Agar

Media Mueller Hinton Agar 34g dilarutkan dalam 1 liter aquades, lalu dipanaskan sampai mendidih dan sambil sesekali diaduk agar homogen. Kemudian media Nutrein Agar disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Media Nutrein Agar dituang sebanyak 10 mL ke dalam cawan petri dan biarkan media memadat (Azizah dkk., 2020).

3.6.7.4 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara menyiapkan media agar yang sudah dibuat sebelumnya kemudian ambil bakteri *Streptococcus pyogenes* pada stok kultur menggunakan jarum ose steril, bakteri dibiakan secara zig-zag pada media nutrien agar dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Azizah dkk., 2020).

3.6.7.5 Pembuatan Larutan *Mc. Farland*

Larutan *Mc. Farland* sebagai larutan standar kekeruhan suspensi bakteri uji dibuat dengan cara mencampurkan 9,95mL asam sulfat (H_2SO_4) dengan barium klorida ($BaCl_2 \cdot H_2O$) sebanyak 0,5mL kedalam tabung reaksi dan dikocok hingga homogen dan terbentuk larutan keruh (Ngajow dkk., 2013).

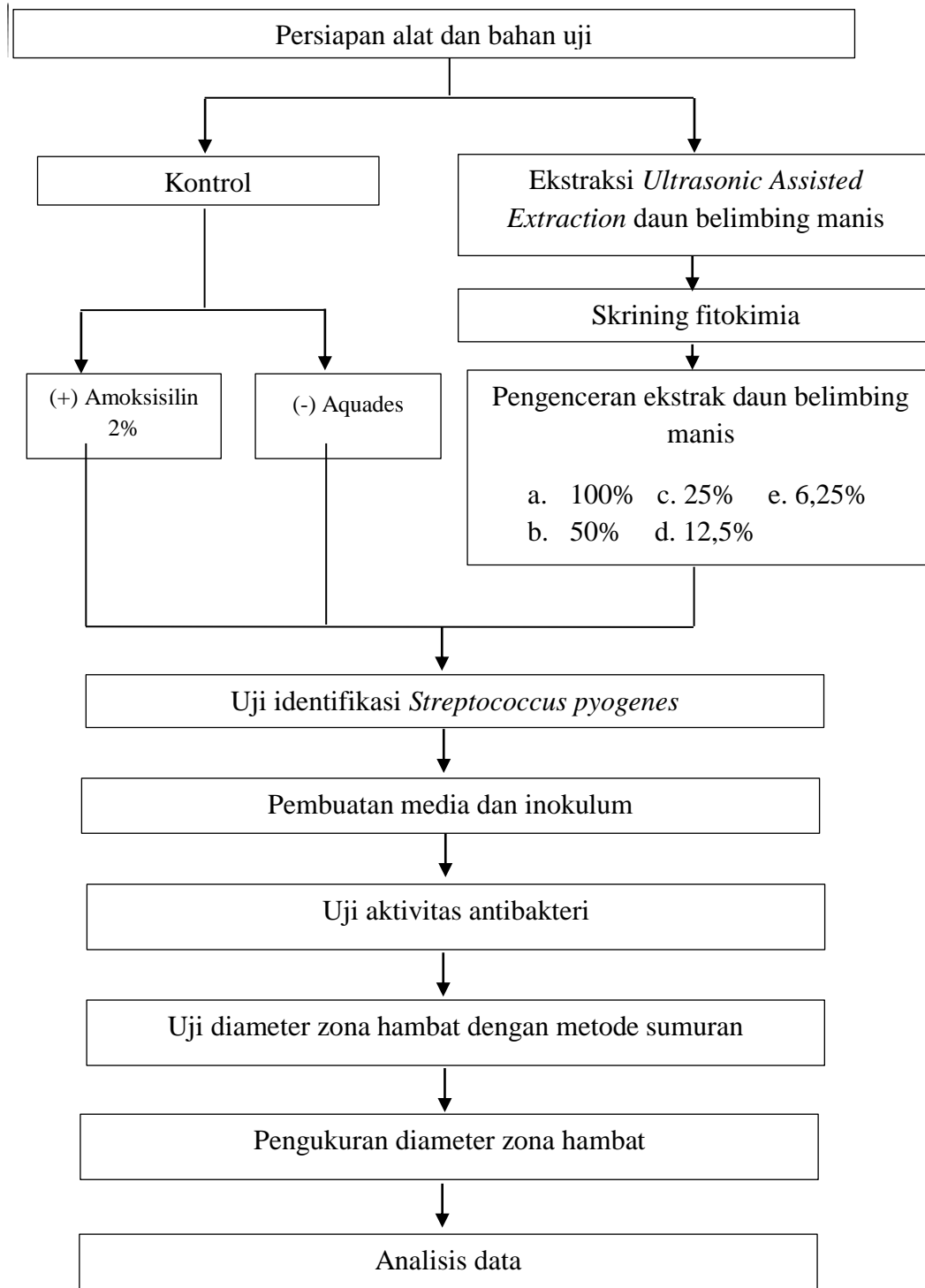
3.6.7.6 Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Streptococcus pyogenes* yang sudah diinokulasi diambil menggunakan jarum ose steril dan disuspensikan ke dalam 10mL NaCl 0,9% dalam tabung reaksi yang steril kemudian dikocok hingga homogen dan keruh sesuai dengan larutan *Mc. Farland* (Azizah dkk., 2020).

3.6.7.7 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Metode pengujian aktivitas antibakteri yang digunakan yaitu dengan jenis metode difusi sumuran. Sumuran berukuran 6 mm dibuat menggunakan pipet steril, media Muller Hinton Agar dicampur dengan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes* dan di masukan ke cawan petri berisi pipet steril, kemudian lubang dari pipet steril diisi ekstrak menggunakan mikropipet sebanyak 50µl dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Untuk kontrol negatif, sumuran ditetaskan dengan 50µl aquades dan untuk kontrol positif sumur ditetaskan dengan 50µl amoksisilin. Kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu, diamati apakah terdapat zona bening yang terbentuk disekitar sumuran. Jika terdapat zona hambat maka dilakukan pengukuran diameter daerah hambatan menggunakan jangka sorong. (Hossain dkk., 2017).

3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.12 Alur Penelitian

3.8 Pengolahan dan Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk tabel dan dianalisis secara *univariat* dan *bivariat* menggunakan program *Statistical Packages for Social Science* (SPSS) di komputer.

3.8.1. Analisis Univariat

Analisis univariat merupakan jenis analisis data pada penelitian satu variabel dengan menggunakan statistik deskriptif untuk mendapatkan *mean*, *median*, dan standar deviasi. Hasil perhitungan statistik univariat akan digunakan sebagai dasar dari perhitungan selanjutnya (Siyoto & Sodik, 2015).

3.8.2. Analisis Bivariat

Analisis bivariat merupakan jenis analisis data yang digunakan untuk melihat hubungan variabel bebas dan variabel terikat (Siyoto & Sodik, 2015). Analisis dilakukan dengan uji normalitas dan uji hipotesis. Uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-wilk* karena sampel berjumlah kurang dari lima puluh, sedangkan untuk uji homogenitas menggunakan uji *Levene* statistik. Jika *p value* yang didapat $<0,05$ maka distribusi data tidak normal dan tidak homogen dan jika *p value* yang didapat $>0,05$ maka distribusi data normal dan homogen.

Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka dapat dilakukan uji *one way ANOVA* yang dilanjut dengan uji *Post Hoc* untuk melihat signifikansi data tiap kelompok. Sebagai alternatif jika datanya tidak terdistribusi normal dan homogen maka digunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis* dilanjut dengan uji *Mann Whitney*.

Interpretasi analisis data yang didapat ialah sebagai berikut

1. Apabila $p < 0,05$ maka hasil dinyatakan ada hubungan bermakna atau signifikan antara variabel bebas dan terikat atau dalam artian lain H_0 ditolak dan H_a diterima.
2. Apabila $p > 0,05$ maka hasil dinyatakan tidak ada hubungan bermakna atau signifikan antara variabel bebas dan terikat atau dalam artian lain H_0 diterima dan H_a ditolak.

3.9 Etika Penelitian

Etika penelitian adalah perilaku ataupun perlakuan peneliti terhadap subjek penelitiannya. Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Lampung selaku institusi tempat penelitian dengan No.399/UN26.18/PP.05.02.00/2023. Surat keterangan persetujuan etik ini terdapat pada **Lampiran 1**.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kandungan senyawa fitokimia yang terkandung dalam ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) pada skrining fitokimia yaitu positif alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid dan tanin.
2. Ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% memiliki diameter zona hambat rata-rata sebesar 11.48 mm, 13.00 mm, 14.66 mm, 16.10 mm, dan 20.58 mm dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

5.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan dari penelitian ini, penulis menyarankan :

1. Bagi Peneliti Selanjutnya
Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kandungan utama daun belimbing manis yang berperan sebagai antibakteri dan untuk mengetahui dosis efektif, toksisitas, dan efek samping pada hewan coba dan uji klinis sebelum digunakan sebagai alternatif pengobatan
2. Bagi Masyarakat
Dapat memberikan informasi kepada masyarakat mengenai aktivitas antibakteri ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L) sebagai tanaman obat dalam menghambat bakteri *Streptococcus pyogenes*.

3. Bagi Institusi Pendidikan

Dapat dijadikan sumber informasi ilmiah tambahan dan dijadikan acuan atau referensi bagi penelitian selanjutnya mengenai manfaat ekstrak metanol daun belimbing manis (*Averrhoa carambola L*) sebagai data dukung Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, khususnya di bidang *agromedicine*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abtian M, Hafrizal R, Fajriaty I. 2019. Skrining fitokimia ekstrak air daun belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.). *Jurnal Farmasi Kalbar*, 04(01): 9–12.
- Abubakar AR, Mainul H. 2020. Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes*, 12(1): 1–10.
- Adhiksana A. 2017. Perbandingan metode konvensional ekstraksi pektin dari kulit buah pisang dengan metode ultrasonik. *Journal of Research and Technology*, 3(2): 80–88.
- Afifi R, Erlin E, Rachmawati J. 2018. Uji anti bakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*averrhoa bilimbi* l) terhadap zona hambat bakteri jerawat *propionibacterium acnes* secara in vitro. *Quagga : Jurnal Pendidikan Dan Biologi*, 10(01): 10.
- Andriani M, Permana IDGM, Widarta. 2019. Pengaruh suhu dan waktu ekstraksi daun belimbing wuluh (*averrhoa bilimbi*l.) Terhadap aktivitas antioksidan dengan metode ultrasonic assisted extraction (uae). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 8(3): 330–340.
- Azike CA, Agi VN, Akere BB. 2019. The prevalence of group a streptococcus as a re-emerging microorganism in port harcourt metropolis. *International Journal of Pathogen Research*, April, 1–6.
- Azizah M, Lingga LS, Rikmasari Y. 2020. Uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol daun seledri (*apium graveolens* l.) Dan madu hutan terhadap beberapa bakteri penyebab penyakit kulit. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(1): 37.
- Badan Pusat Statistik. 2022. Produksi tanaman buah-buahan. Jakarta. <https://www.bps.go.id/indicator/55/62/1/produksi-tanaman-buah-buahan.html>
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71–79.
- CDC. 2021. *Streptococcus Pyogenes*. <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/index.html>

- Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A. 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: Approved standard - Eleventh edition* (Vol. 32, Issue 1).
- Craft, N. 2022. Chapter 176. Superficial cutaneous infections and pyodermas : introduction staphylococcal skin infections epidemiology etiology and pathogenesis. In *Access Medicine*.
- Cronquist, A. 1981. An intergrated system of clasification of flowering plants. In *Columbia University Press* (Vol. 7, Issue 2).
- Dasgupta, P., Chakraborty, P., & Bala, N. 2013. Averrhoa carambola: an updated review. *International Journal of Pharma Research & Review*, 2(7): 54–63.
- Davis, W. W., & Stout, T. R. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Applied Microbiology*, 22(4): 659–665.
- Dessie AM, *et.al.* 2022. Prevalence of skin disease and its associated factors among primary schoolchildren: a cross-sectional study from a northern ethiopian town. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 15, 791–801.
- Endarini LH. 2016. *Farmakognosi dan Fitokimia Komperehensif*.
- Etebu E, Ariekpar I. 2014. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*, 2014.
- Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA. 2017. *Streptococcus pyogenes basic : biology to clinical manifestations* (Issue 512). University of Oklahoma Health Sciences Center.
- Hassan MN, Laily AN. 2014. Uji kandungan flavonoid dan perbandingan aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol simplisia bunga pepaya gantung saat kuncup dan mekar. *Jurnal Skrining Bioaktif*, 1(1): 1–15.
- Hossain T, Barman AK, Karmakar UK, Bokshi B, Dev S. 2017. Phytochemical and pharmacological evaluation of leaves of averrhoa carambola linn . (family : bioscience and bioengineering communications phytochemical and pharmacological evaluation of leaves of averrhoa car. *Bioscience and Bioengineering Communications*, 3(January), 144–151.
- Departemen Indonesia. 2017. Farmakope herbal indonesia Edisi II. In *Farmakope Herbal Indonesia*.

- Isnaeni D, Rasyid AUM, Rahmawati. 2021. Uji aktivitas ekstrak daun opo-opo (*desmodium pulchellum linn benth*) sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *streptococcus viridans* dan *streptococcus pyogenes*. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 3(2): 278–289.
- Jawetz, Melnick, Adelbergs. 2019. *Medical microbiology, Twenty-Eighth Edition*. McGraw Hill.
- Julianto TS. 2018. Fitokimia tinjauan metabolit sekunder dan skrining fitokimia. In *journal of chemical information and modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Karimkhani C, *et.al.* 2017. Global skin disease morbidity and mortality an update from the global burden of disease study 2013. Supplemental content cme quiz at jamanetwork.com/learning and cme questions page 484. *JAMA Dermatol*, 153(5): 406–412.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. 2014. Basic and clinical pharmacology. In *McGrawHill* (12th ed., Vol. 2).
- Lakmal K, Yasawardene P, Jayarajah U, Seneviratne SL. 2021. Nutritional and medicinal properties of Star fruit (*Averrhoa carambola*): A review. *Food Science and Nutrition*, 9(3): 1810–1823.
- Lannes-Costa PS, de Oliveira JSS, da Silva Santos G, Nagao PE. 2021. A current review of pathogenicity determinants of *Streptococcus sp.* *Journal of Applied Microbiology*, 131(4): 1600–1620.
- Luan F, *et.al.* 2021. Traditional uses, phytochemical constituents and pharmacological properties of *averrhoa carambola l.*: A Review. *Frontiers in Pharmacology*, 12(August), 1–27.
- Luliana S, Purwanti NU, Manihuruk KN. 2016. Pengaruh cara pengeringan simplisia daun senggani (*melastoma malabathricum l.*) Terhadap aktivitas antioksidan menggunakan metode dpph (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). *Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(3): 120–129.
- Mardhiyah S, Elya B, Noviani A. 2020. Elastase activity inhibition by the most active fraction of star fruit (*Averrhoa Carambola L.*) leaves from three west java regions. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 12(Special Issue 1), 101–106.
- Mazza G. 2022. *Averrhoa Carambola*. Monaco Nature Encyclopedia.
- Mulyati W, Lukmayani Y, Sadiyah ER. 2020. Uji aktivitas antibakteri daun belimbing manis (*averrhoa bilimbi l .*) Terhadap *staphylococcus epidermidis* serta identifikasi golongan senyawa aktifnya. *Prosiding Farmasi*, 6(1): 62–67.
- Ngajow M, Abidjulu J, Kamu VS. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang

- matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal MIPA*, 2(2), 128.
- Nugraha AC, Prasetya AT, Mursiti S. 2017. Isolasi, identifikasi, uji aktivitas senyawa flavonoid sebagai antibakteri dari daun mangga. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(2): 91–96.
- Nurhidayati S, Faturrahman F, Ghazali M. 2015. Deteksi bakteri patogen yang berasosiasi dengan *Kappaphycus alvarezii* (Doty) bergejala penyakit ice-ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*, 1(2): 24–30.
- Osowicki J, *et.al.* (2019). Controlled human infection for vaccination against *Streptococcus pyogenes* (CHIVAS): Establishing a group A *Streptococcus* pharyngitis human infection study. *Vaccine*, 37(26): 3485–3494.
- Pertiwi RD, Kristanto J, Praptiwi GA. 2016. Uji aktifitas antibakteri formulasi gel untuk sariawan dari ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 2(2): 239–247.
- Pribadi AD, Yudhana A, Chusniati S. 2020. Isolasi dan identifikasi *Streptococcus* sp. Dari sapi perah penderita mastitis subklinis di Purwoharjo Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*, 3(1): 51.
- Qomar MS, Budiyanto MAK, Sukarsono S, Wahyuni S, Husamah H. 2018. Efektivitas berbagai konsentrasi ekstrak daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii* [Ness.] Bi) terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal Biota*, 4(1): 12–18.
- Sastroasmoro S. 2014. *Dasar-dasar metodologi penelitian*. Sagung Seto.
- Siyoto S, Sodik MA. 2015. *Dasar Metodologi Penelitian*.
- Soedarto, S. 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Segung Seto.
- Sudarmi K, Darmayasa IBG, Muksin IK. 2017. Uji fitokimia dan daya hambat ekstrak daun juwet (*Syzygium cumini*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ATCC. *Journal of Biological Sciences*, 5(2): 47.
- Sukor N, Jusoh R, Rahim SA, Kamarudin N. 2018. Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phenolic acids from *Quercus infectoria* galls. *Materials Today: Proceedings*, 5(10): 21990–21999.
- Syafitri IF, Ersam T. 2016. Senyawa sikloartobiloksanon dari kulit akar. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 5(2): 80–84.
- Syahrir A, Sulaiman S, Mel M, Othman M. 2020. An overview: analysis of ultrasonic-assisted extraction's parameters and its process. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 778(1):012165.

- Torres NM, Talavera TA, Andrews HE, Contreras AS, Pacheco N. 2017. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3).
- Wahyuni R, Guswandi, Rivai H. 2014. Pengaruh cara pengeringan dengan oven, kering angin dan cahaya matahari langsung terhadap mutu simplisia herba sambiloto. *Fakultas Farmasi Universitas Andalas (UNAND) Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang*, 6(2): 126–133.
- Wang X, Xu LP. 2014. Ultrasonic-assisted extraction and antibacterial properties of polyphenols of sweet corn cob. *Advanced Materials Research*, 1028, 374–379.
- Whiley RA, Hardie JM. 2015. Streptococcus. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Yunita, Nursanty R. 2019. Aktivitas antibakteri belimbing manis (averrhoa carambola l.) Terhadap methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA). *Jurnal Bioleuser*, 3(2): 32–34.
- Zhang QW, Lin LG, Ye WC. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1): 1–26.