



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PENGEMBANGAN POTENSI ANTIBAKTERI KELOPAK BUNGA  
*Hibiscus sabdariffa* L. (ROSELA) TERHADAP *Streptococcus sanguinis*  
PENGINDUKSI GINGIVITIS MENUJU  
OBAT HERBAL TERSTANDAR**

**DISERTASI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor**

Trijani Suwandi

0906598392


**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI  
JAKARTA  
JULI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Disertasi adalah hasil karya saya sendiri  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Trijani Suwandi

NPM : 0906598392

Tanda Tangan : 

Tanggal : 13 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh :

Nama : Trijani Suwandi

NPM : 0906598392

Judul disertasi : Pengembangan Potensi Antibakteri Kelopak Bunga *Hibiscus sabdariffa* L. (Rosela) Terhadap *Streptococcus sanguinis* Penginduksi Gingivitis Menuju Obat Herbal Terstandar

**Telah lolos etik penelitian dan telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia**

### DEWAN PENGUJI

Promotor : Drg. Dewi Fatma, MS, Ph.D

Kopromotor : Prof. S.W.Prayitno, drg,SKM,MScD,Ph.D,Sp.Perio (K)

Tim Penguji : Prof. drg. Boy M Bachtiar, MS, Ph.D (Ketua)

Prof. Dr. Frans D Suyatna, PhD, SpFK (Anggota)

Prof. Janti Sudiono, drg., MDS (Anggota)

Dr. Marline Abdasah, MS, Apt (Anggota)

Adang Bachtiar, dr, MPH, DSc (Anggota)

Dr. Yuniarti Soeroso, drg, Sp.Perio (K) (Anggota)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 12 Juli 2012

**Universitas Indonesia**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Segala Puji dan Syukur saya panjatkan kepadaMu, Ya Allah Bapa di Surga, yang telah melimpahkan kasih karunia dan berkat-Nya pada hambamu, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Atas perkenan Allah Bapa di Surga dan campur tangan-Nya, maka penelitian dan penyusunan disertasi ini dapat diselesaikan. Terpujilah Tuhan, yang telah membuat segala sesuatu indah pada waktunya.

Penelitian dan penulisan disertasi ini masih jauh dari sempurna. Bimbingan, asupan, saran, kritik, semangat, dorongan dan nasihat dari pembimbing, pengajar, penguji, teman sejawat, keluarga, sahabat dan berbagai pihak telah saya terima, sehingga disertasi ini dapat diselesaikan tepat waktu. Pada kesempatan ini, dari lubuk hati yang paling dalam perkenankanlah saya menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang tulus dan tak terhingga kepada berbagai pihak berikut ini :

Terima kasih kepada Rektor Universitas Indonesia Prof. Dr. der Soz. Gumilar Rusliwa Somantri beserta para Wakil Rektor yang telah mengizinkan saya mengikuti pendidikan doctoral ini. Terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia Prof. Bambang Irawan, drg., Ph.D beserta Wakil Dekan atas kebaikan, bantuan serta fasilitas yang diberikan kepada saya selama saya menempuh pendidikan doktor. Terima kasih juga saya sampaikan kepada Manager Pendidikan Dr. Ellyza Herda, drg., M.Si dan Koordinator Pendidikan Dr. Ratna Meidyawati, drg., Sp.KG (K), atas segala perhatian dan bantuan baik akademis maupun administratif, sehingga saya bisa menyelesaikan disertasi ini.

Terima kasih saya ucapkan kepada Rektor Universitas Trisakti Prof. DR. Thoby Mutis, SE. serta para Wakil Rektor, Dekan FKG Universitas Trisakti Prof. Dr. Bambang S. Trenggono, drg, Mbiomed periode 1997-2005, Dekan FKG Universitas Trisakti Prof. Dr. Melanie S. Sadono, drg, Mbiomed, serta para Wakil Dekan FKG Universitas Trisakti, yang telah mengizinkan saya untuk menempuh pendidikan doktor pada Fakultas kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

Penghargaan setinggi-tingginya dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada drg. Dewi Fatma, MS., Ph.D selaku promotor yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan, pendampingan dan pengarahan dalam setiap tahap penelitian ini baik dari perencanaan, pelaksanaan sampai penyusunan disertasi ini dengan penuh kesabaran serta

ketelitian, serta senantiasa memberikan semangat dan dorongan supaya saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Demikian juga penghargaan setinggi-tingginya dan ucapan terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada ko-promotor Prof. S.W. Prayitno, drg.,SKM.,MSc.D,Ph.D.,Sp.Perio (K), sebagai ibu, guru dan pembimbing. Di tengah-tengah kesibukannya, beliau berkenan meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan dan memberikan banyak inspirasi dan pemikiran, nasihat, dorongan dan semangat kepada saya sejak awal pendidikan hingga penyusunan disertasi ini. Semoga Allah Bapa di Surga senantiasa memberikan kesehatan yang baik kepada beliau dan keluarganya.

Terima kasih yang tidak terhingga saya sampaikan kepada tim penguji Prof. Boy M Bachtiar, drg., MS., Ph.D.; Prof. Dr. Frans D Suyatna, Ph.D., Sp.FK.; Prof. Janti Sudiono, drg., MDS., Dr. Marline Abdasah, MS., Apt.; dr. Adang Bachtiar, MPH., DSc., dan Dr. Yuniarti Soeroso, drg., Sp.Perio (K). Terima kasih yang setinggi-tingginya serta rasa hormat yang dalam atas kesediaannya menjadi penguji serta segala masukan dan pengarahan yang sangat berguna, untuk kesempurnaan disertasi saya.

Ucapan terima kasih yang tulus kepada Ketua Departemen Oral Biologi FKG UI drg. Ariadna Djais, M.Biomed, Ph.D dan Kepala Laboratorium FKG UI Prof. Boy M Bachtiar, drg., MS., Ph.D yang telah memberikan wawasan tentang penelitian eksperimental laboratorium, memberikan bimbingan dan pengarahan serta memberikan izin penggunaan fasilitas Laboratorium Oral Biologi. Terima kasih juga saya sampaikan kepada staf laboratorium Oral Biologi FKG UI yaitu Ibu Maysyaroh, S.Si dan Ibu Dessy Sulistya Ashari, S.Si dan Bapak Djaja Suhardja yang selalu membantu dengan sabar tanpa mengenal waktu, selama saya melakukan penelitian. Ucapan terima kasih yang tulus juga saya sampaikan kepada Ketua Komisi Etik Penelitian FKG UI drg Anton Rahardjo, MKM, Ph.D dan staf yang telah memberikan surat lolos etik penelitian.

Ucapan terima kasih yang tulus kepada Prof. Dr. Frans D Suyatna, Ph.D, Sp.FK. yang telah memberikan wawasan, pengetahuan, bimbingan, pengarahan serta mengizinkan menggunakan fasilitas di laboratorium Farmakologi dan Toksikologi FK UI. Terima kasih kepada staf Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi FK UI yaitu Bapak Dede dan Bapak Arif yang telah membantu dengan penuh kesabaran tanpa mengenal waktu dalam melakukan uji toksisitas.

Ucapan terima kasih juga saya haturkan kepada Dr. Marline Abdasah, MS., Apt. yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan pada awal penelitian saya dalam pembuatan ekstrak. Terima kasih yang tulus dan sebesar-besarnya kepada Bapak Usmadi, drh. Winarno serta seluruh staf dari Laboratorium Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Farmasi Badan Litbangkes Depkes RI yang telah membantu dan membimbing saya dalam pembuatan ekstrak etanol kelopak bunga *H.sabdariffa*.

Terima kasih yang tulus dan penghargaan yang setinggi-tingginya untuk Prof. Tritana Gondhoyowono, drg., M.Psi, Ph.D yang telah mendorong dan memberi semangat untuk mengikuti program doktoral ini. Kepada Prof. Janti Sudiono, drg., MDSc. selaku ketua Dewan Riset FKG Usakti, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas perhatian, bimbingan, dan bantuan, khususnya dalam menganalisis hasil histopatologis.

Kepada dr. Adang Bachtiar, MPH., DSc. saya mengucapkan terima kasih atas bimbingan dan bantuannya pada saat penyusunan proposal sampai pada penulisan disertasi ini. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada drg. Widijanto, M. Kes dan Dr. Kuncono Teguh Yunanto, S.Psi, MM. yang telah memberikan masukan dalam pengolahan dan penyajian data. Terima kasih yang sebesar-besarnya untuk Prof. DR. dr. Adi Hidayat, MS. atas saran pemilihan jurnal untuk publikasi internasional, sehingga memudahkan saya memilih jurnal internasional.

Terima kasih yang tulus dan hormat saya kepada Kepala Bagian Periodonti FKG Usakti drg. Setiyohadi, Sp.Perio periode 2005-2009 yang telah mengizinkan dan memberi kesempatan kepada saya untuk mengambil program doktor ini. Demikian juga untuk Kepala Bagian Periodonti Dr. drg. Lies Zubardiah M. Qosim, Sp. Perio terima kasih yang sebesar-besarnya atas nasehat, semangat, dan masukan-masukannya dalam penelitian ini. Rasa terima kasih saya sampaikan kepada teman-teman sejawat di Bagian Periodonti FKG Usakti drg. Agus Susilo, Sp. Perio, drg. Luki Astuti, Sp.Perio, drg. Jetti Erawati, Sp.Perio, drg. Abdul Gani Soulisa, MPH. dan drg. Victor Emmanuel, Sp.Perio, atas segala perhatian dan bantuannya untuk mengambil alih semua tugas saya di Bagian Periodonti selama saya mengikuti pendidikan ini. Kepada drg. Victor terima kasih yang tidak terhingga atas bantuannya dalam mengedit makalah, juga ucapan terima kasih kepada staf administrasi pak Salimi, mbak Yuli yang telah membantu saya.

Terima kasih saya ucapkan kepada para Guru Besar dan seluruh staf dosen FKG UI atas segenap keramah-tamahannya menerima saya sebagai bagian dari Sivitas Akademika FKG UI, sehingga saya merasa seperti di rumah sendiri, terutama teman-teman sejawat staf dosen di Departemen Periodonsia : Prof. Dr. Dewi Nurul M, drg., Msc, Sp.Perio (K), Dr. Sri Lelyati Chaidar, drg., SU, Sp.Perio (K), drg. Emile Louis Supit, Sp.Perio (K), drg. Irene Sukardi, Sp.Perio (K), drg. Yulianti Kemal, Sp.Perio (K), drg. Hari Sunarto, Sp.Perio (K), drg. Robert Lessang, Sp.Perio (K), drg. Natalina, Sp.Perio (K), drg. Fatimah Tadjoeidin, Sp.Perio, drg. Yudha, Sp.Perio, drg. Irwan, Sp.Perio, dan drg. Felix, Sp.Perio. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan untuk staf administratif periodontik yaitu mbak Leni dan staf administratif Biologi Oral ibu Mutasilah dan Mbak Sartila, SE. saya mengucapkan terima kasih atas bantuan dan kebaikannya kepada saya.

Ucapan terima kasih kepada staf administrasi Pendidikan S3, Ibu Neneng Tarwiyah, SE. dan Ibu Erni Ismiyati, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala bantuannya khususnya dalam urusan administrasi baik pada saat awal sampai akhir saya mengikuti pendidikan, demikian juga ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Ibu Emy Yunara, Amd dan Ibu Daryati. Kepada staf Perpustakaan FKG Universitas Indonesia Bapak Asep Rahmat Hidayat, Sip, Bapak M. Enouh, SE., Bapak Yanto, dan staf Perpustakaan FKG Universitas Trisakti Ibu Devi dan Ibu Widi, saya ucapkan terima kasih atas segala bantuannya dalam menyiapkan referensi.

Ucapan terima kasih yang tulus saya ucapkan kepada kedua pendamping saya drg. Yohana Yusra, M.Kes dan drg. Ira Tanti, SpPros yang telah membagikan waktunya untuk mendampingi saat promosi doktor. Kepada teman-temanku peserta pendidikan S3 angkatan 2009 yaitu drg. Chair, SpKGA.; drg. Tien Suwartini, SpKons.; drg. Wuri, M.Kes.; drg. Febriana Toto, Mkes.; drg. Ananta Ruri, SpPM.; drg. Lilies, SpBM.; drg. Eva Fauziah, SpKGA.; drg. Atma Gunawan, SpKons.; drg. Dewi Anggraini, SpKons.; drg. Sari, SpKons.; drg. Yulitri, SpPerio.; drg. Irene, SpOrt. Terima kasih atas kebersamaan yang indah terutama di semester pertama dan kedua yang tidak terlupakan. Terima kasih atas kerjasamanya dalam mengerjakan tugas-tugas kelompok. Semoga kita semua dapat berhasil dan sukses dalam menyelesaikan studi ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada keluarga drg. Sundjoyo yang telah membantu pada persiapan acara promosi doktor. Terima kasih saya ucapkan kepada

teman sejawat dan paramedis di Tifanie Esthetic Dental : drg. Sally, drg. Sohpia, drg. Pipin, drg. Nadia yang telah mendukung, membantu dan menggantikan praktek, bilamana saya berhalangan selama masa pendidikan ini, juga kepada Siti, Nuri, Dian, Dini dan Ida yang senantiasa direpotkan harus mengatur ulang jadwal praktek sehubungan dengan masa studi ini.

Kepada teman-teman di Departemen Bedah Mulut Rumah Sakit Siloam Kebun Jeruk : drg. Bastian Tedyasihto, Sp. BM, Ph.D; drg. Raimud, Sp. BM, drg. Aya Sohpia, Sp.KGA, drg. Ruby Kusnadi, drg. Wendy dan drg. Merlyn, juga buat paramedis Sri dan Ani, terima kasih atas segala dukungan dan doanya. Terima kasih yang tulus saya ucapkan kepada drg. Ruby Kusnadi, yang senantiasa siap menggantikan praktek, pada saat saya harus melakukan penelitian dan saat-saat akhir penyusunan disertasi ini.

Kepada mama Hoo Joe Tien dan papa Wen Kuang Ling yang saya hormati dan cintai. Terima kasih telah membesarkan, mendidik, dan membimbing dan memberikan dasar pendidikan pada saya sejak kecil dan menanamkan sikap kerendahan hati. Mama dan papa yang selalu menyebutkan nama saya di dalam setiap doanya. Tidak ada yang dapat saya berikan untuk membalas pengorbanan mama dan papa. Terima kasih yang tak terhingga saya haturkan kepada Baba di Surga untuk senantiasa memberkati dan memberikan kesehatan kepada mama dan papa.

Terima kasih yang tak terhingga kepada papa (alm) dan mama mertua Tan Swie Nio yang senantiasa mendoakan dan memberikan dukungan kepada saya dan keluarga. Ucapan terima kasih yang tulus untuk kakakku dan kakak ipar dr. Trijono Suwandi, M.Biomed Anti Aging dan dr. Endang Setiawati, juga kepada adikku May Suwandi, SE, MIB, MAF. dan Marta Widjaja yang senantiasa memberi semangat, menghibur dan senantiasa mendoakan saya. Terima kasih yang tulus saya ucapkan kepada semua kakak ipar dan keluarga yang senantiasa mendoakan dan mendukung saya hingga terselesaikannya disertasi ini, khususnya kepada kakakku dra. Fransisca Andreani, MM yang telah membantu mengedit ringkasan disertasi. Kepada semua saudara dan teman-teman, juga sahabatku, drg. Anggraeni, Sp. Perio yang telah membantu saya selama ini, terima kasih atas dukungan doanya.

Kepada keluargaku, ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan tulus serta rasa cinta kasih saya yang dalam untuk suami dan kekasih tercinta Ir. Kurnia Wibowo sebagai pendamping, penghibur, pemberi semangat dan senantiasa mendukung dan mendoakan saya. Terima kasih untuk semua kesabaran dalam menggantikan tugas saya sebagai ibu untuk



menemani dan membimbing anak-anak karena kesibukan selama menempuh pendidikan ini. Juga untuk anak-anak yang kucintai Cynthia Kartika dan James Sebastian yang senantiasa menghibur, mendoakan dan memberi semangat, terima kasih sayang. Maafkan mama kalau selama ini perhatian mama berkurang karena kesibukan mama belajar dan bekerja. Mama bangga dengan segala yang ada pada Cynthia dan James. Doa mama senantiasa menyertai agar kalian menjadi pribadi yang baik, mandiri dan menjadi berkat bagi banyak orang.

Akhirnya dengan penuh kerendahan hati, saya ingin menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan tugas belajar dan penelitian saya ini, yang tidak dapat saya sebutkan namanya satu persatu, saya ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang setulus-tulusnya. Pada kesempatan ini saya mohon maaf yang sebesar-besarnya, sekiranya ada kesalahan dalam perbuatan dan perkataan saya. Semoga Bapa di Surga membalas kebaikan saudara-saudaraku semua dengan berlipat-lipat atas segala budi baik telah diberikan kepada saya selama ini, dan semoga disertasi ini bermanfaat serta membawa berkat bagi kita semua. Amin.

Jakarta, 13 Juli 2012

Trijani Suwandi

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Trijani Suwandi  
NPM : 0906598392  
Program studi : Ilmu Kedokteran Gigi  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Jenis Karya : Disertasi

Demi kepentingan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti noneksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**“PENGEMBANGAN POTENSI ANTIBAKTERI KELOPAK BUNGA *Hibiscus sabdariffa*  
L. (ROSELA) TERHADAP *Streptococcus sanguinis* PENGINDUKSI GINGIVITIS  
MENUJU OBAT HERBAL TERSTANDAR”**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti non eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta  
Pada tanggal : 13 Juli 2012

Yang menyatakan



(Trijani Suwandi)

## ABSTRAK

Nama : Trijani Suwandi  
Program Studi : Ilmu Kedokteran Gigi  
Judul : Pengembangan Potensi Antibakteri Kelopak Bunga *Hibiscus sabdariffa* L. (Rosela) Terhadap *Streptococcus sanguinis* Penginduksi Gingivitis Menuju Obat Herbal Terstandar

Disertasi ini merupakan hasil penelitian eksperimental laboratorik yang mencakup: uji fitokimia ekstrak etanol *H. sabdariffa* L. yang bersifat antibakteri, uji penetapan parameter standar, uji KHM, KBM, zona hambat, uji toksisitas akut dan subkronis, uji sitotoksitas terhadap sel epitel dan fibroblast serta uji efektivitas ekstrak *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis*. Penelitian ini merupakan penelitian analitik kuantitatif. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *H. sabdariffa* L. mengandung golongan senyawa antibakteri fenol, flavonoid, tanin dan saponin. Parameter standar dapat ditetapkan. Hasil KHM dan KBM 0,78%, dan zona hambat *H. sabdariffa* L. setara dengan klorheksidin. Ekstrak ini aman dan tidak toksik terhadap organ vital tikus pada uji toksisitas akut dan subkronis. Hasil MTT assay menunjukkan ekstrak tidak toksik terhadap sel epitel dan fibroblast. Hasil uji *biofilm* menunjukkan ekstrak *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* pada *biofilm*.

Kata kunci : *H. sabdariffa* L., *S. sanguinis*, antibakteri, uji toksisitas, uji MTT assay, uji *biofilm*

## ABSTRACT

Name : Trijani Suwandi  
Program Study : Ph.D in Dental Science  
Title : The Antibacterial Potency Development of *Hibiscus sabdariffa* L. calyx (Rosela) to *Streptococcus sanguinis* as Gingivitis Inducer Toward Scientific Based Herbal Medicine

This dissertation is the result of laboratory experimental study involving phytochemistry test from ethanol extract of *H. sabdariffa* L. and to detect the standard parameters, MIC, MBC test, and inhibition zone, the acute and subchronic toxicity tests and the epithelial and fibroblast cytotoxicity tests. The effectiveness of the *H. sabdariffa* L. extracts in suppression of the *S. sanguinis* were also measured. This was a quantitative with analytical design study. The result of this study showed that in the ethanol extract *H. sabdariffa* L. contained phenol, flavonoid, tannin and saponin compounds. These compounds are well known antibacterial compounds. The sensitivity tests showed that the MIC and MBC of *H. sabdariffa* L. was 0,78%, while the inhibition zone of *H. sabdariffa* L. was equivalent to chlorhexidine. The acute and subchronic toxicity tests showed that this compound was non-toxic. The MTT assay tests showed that the compound were not toxic to epithelial cell and fibroblast. The biofilm test showed that the extract of *H. sabdariffa* L. was a potent suppressor of *S. sanguinis*.

Key words : *H. sabdariffa* L., *S. sanguinis*, antibacterial, toxicity test, MTT assay test, *biofilm* test

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH.....	x
ABSTRAK.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xx
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxiii
<b>1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	8
1.3 Tujuan Penelitian.....	8
1.4 Manfaat Penelitian.....	10
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>12</b>
2.1 Gingivitis.....	12
2.1.1 Plak Gigi atau Biofilm Rongga Mulut.....	14
2.1.2 <i>Streptococcus sanguinis</i> .....	19
2.2 Pencegahan dan Perawatan Gingivitis.....	22
2.3 Obat Tradisional.....	26
2.4 <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	32
2.5 Senyawa Aktif.....	37
2.6 Teknologi Ekstraksi.....	39
2.6.1 Pengertian Ekstraksi.....	39
2.9.2 Prosedur Ekstraksi.....	40
2.7 Penetapan Parameter Standarisasi Ekstrak.....	44
2.7.1 Parameter Non Spesifik.....	44
2.7.2 Parameter Spesifik.....	44
2.8 Uji Sensitivitas Bakteri.....	45
2.8.1 Metode Dilusi.....	45
2.8.2 Metode Difusi.....	46
2.9 Uji Toksisitas Obat.....	47
2.10 Hewan Coba.....	51
2.11 Mukosa Mulut.....	52
2.12 Kultur Sel.....	55
2.13 Uji Toksisitas Sel dengan <i>MTT Assay</i> .....	57
2.14 Uji <i>Biofilm</i> dengan <i>Crystal Violet</i> .....	58

2.15 Kerangka Teori.....	60
<b>3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....</b>	<b>61</b>
3.1 Kerangka Konsep.....	61
3.2 Hipotesis.....	63
<b>4. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>64</b>
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	64
4.2 Alur Penelitian.....	65
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian .....	66
4.4 Material dan Subyek Penelitian .....	66
4.5 Besar Sampel.....	67
4.6 Identifikasi Variabel.....	67
4.7 Definisi Operasional.....	69
4.8 Bahan, Alat dan Cara Kerja Penelitian.....	71
4.8.1 Tahap Penyediaan Simplisia.....	71
4.8.2 Tahap Ekstraksi.....	73
4.8.3 Analisis Fitokimia Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa L.</i> .....	74
4.8.4 Uji Parameter Standar Ekstrak.....	78
4.8.5 Uji sensitivitas dengan metode Dilusi dan Difusi.....	80
4.8.6 Uji Toksisitas Akut Pada <i>Spraque-Dawley</i> .....	85
4.8.7 Uji Toksisitas Subkronis.....	87
4.8.8 Uji Toksisitas Khusus Terhadap Sel Epitel dan Fibroblast.....	95
4.8.9 Uji <i>Biofilm</i> dengan <i>Crystal Violet</i> .....	99
4.9 Pengolahan Data.....	104
4.10 Masalah Etika.....	105
<b>5. HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>106</b>
5.1 Identifikasi Tanaman dan Analisis Fitokimia.....	106
5.2 Parameter standar.....	107
5.3 Analisis Metode Dilusi (KHM, KBM) dan Difusi (Zona Hambat).....	108
5.4 Uji Toksisitas Akut Pada <i>Spraque-Dawley</i> .....	111
5.5 Uji Toksisitas Subkronis Pada Tikus.....	114
5.6 Uji Sitotoksisitas Terhadap Sel Epitel dan sel Fibroblast.....	127
5.7 Uji <i>Biofilm</i> dengan <i>Crystal Violet</i> .....	133
<b>6. PEMBAHASAN.....</b>	<b>139</b>
6.1 Dasar Pemikiran Penyusunan Desain Penelitian.....	139
6.2 Uji Skrining Fitokimia.....	140
6.3 Parameter Standar Ekstrak Etanol Kelopak <i>H. sabdariffa L.</i> .....	142
6.4 Uji KHM, KBM, Zona Hambat .....	143
6.5 Uji Toksisitas Akut.....	146
6.6 Uji Toksisitas Subkronis.....	147
6.7 Uji Sitotoksisitas Sel Epitel dan Sel Fibroblast.....	150

6.8 Uji <i>Biofilm</i> dengan <i>Crystal Violet</i> .....	152
<b>7.KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	156
7.1 Kesimpulan.....	156
7.2 Saran.....	156
<b>DAFTAR REFERENSI</b> .....	158
LAMPIRAN.....	170



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Kumpulan Bakteri yang Ditemukan Dalam Plak.....	18
Tabel 2.2.	Peningkatan Toleransi terhadap Agen Antimikrobal Ketika Bakteri Tumbuh Sebagai <i>Biofilm</i> .....	24
Tabel 2.3.	Klasifikasi Derajat Toksisitas Akut.....	48
Tabel 2.4.	Tanda-Tanda Toksik pada Organ dan Sistem.....	49
Tabel 4.1.	Definisi Operasional.....	69
Tabel 4.2.	Serial Dilution Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H.sabdariffa</i> L. dari stok 50%.....	102
Tabel 5.1.	Kandungan Golongan Senyawa Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L.....	107
Tabel 5.2.	Hasil Pemeriksaan Parameter Standar Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L.....	108
Tabel 5.3.	Hasil KHM Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L.....	109
Tabel 5.4.	Penetapan KHM dan KBM Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L. Berdasarkan Penggoresan pada Plat Agar.....	109
Tabel 5.5.	Rerata Diameter Zona Hambat Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol <i>H. sabdariffa</i> L. terhadap <i>S. sanguinis</i> dan Nilai Kemaknaannya.	110
Tabel 5.6.	Pengamatan Mortalitas Tikus yang Diberi Ekstrak Etanol Kelopak <i>H. sabdariffa</i> L.....	112
Tabel 5.7.	Berat Badan Rata-Rata Tikus Jantan dan Betina.....	117
Tabel 5.8.	Nilai Rata-Rata Hb dan Leukosit Tikus Jantan dan Betina setelah Pemberian Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L.....	119
Tabel 5.9.	Pengaruh Berbagai Dosis Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L. terhadap Kimia Darah Tikus Jantan dan Betina.....	120
Tabel 5.10.	Berat Organ Dalam Tikus Jantan dan Betina.....	122

Tabel 5.11	Viabilitas (%) Sel Epitel setelah Dipapar Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L. selama 24 jam .....	128
Tabel 5.12.	Viabilitas (%) Sel Fibroblast Setelah Dipapar Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L. selama 24 jam.....	130
Tabel 5.13.	Jumlah Koloni <i>S. sanguinis</i> (CFU/mL) pada <i>Serial Dilution</i> $10^{-1}$ - $10^{-8}$ .....	134
Tabel 5.14.	Potensi Pertumbuhan <i>Biofilm S. sanguinis</i> pada Fase <i>Adherence</i> (20 jam) Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan .....	135
Tabel 5.15.	Potensi Pertumbuhan <i>Biofilm S. sanguinis</i> pada Fase <i>Maturasi</i> (24 jam) Pada kelompok Kontrol dan Perlakuan.....	136





## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Pembentukan <i>Biofilm</i> .....	16
Gambar 2.2.	Interkomunikasi Bakteri Plak.....	17
Gambar 2.3.	Lambang Obat Tradisional.....	28
Gambar 2.4.	Foto Tanaman <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	33
Gambar 2.5.	Pengukuran Zona Hambat.....	46
Gambar 2.6.	Kerangka Teori.....	60
Gambar 3.1.	Skrining Fitokimia.....	61
Gambar 3.2.	Penetapan Parameter Standar.....	61
Gambar 3.3.	Uji KHM, KBM, Zona Hambat.....	61
Gambar 3.4.	Uji Toksisitas Akut.....	62
Gambar 3.5.	Uji Toksisitas Subkronis.....	62
Gambar 3.6.	Uji Sitotoksisitas.....	62
Gambar 3.7.	Uji <i>Biofilm</i> .....	63
Gambar 4.1.	Bagan Alur Penelitian.....	65
Gambar 4.2.	Alur Cara Penyiapan Ekstrak.....	73
Gambar 4.3.	Bagan Alur Pemeriksaan Alkaloid.....	75
Gambar 4.4.	Bagan Alur Pemeriksaan Saponin, Steroid, Triterpenoid.....	77
Gambar 4.5.	Bagan Alur Pemeriksaan Flavonoid dan Tanin.....	78
Gambar 4.6.	Bagan Penetapan Parameter Standar.....	80
Gambar 4.7.	Pengenceran <i>S. sanguinis</i> .....	82
Gambar 4.8.	Pengenceran Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L.....	82
Gambar 4.9.	Uji KHM Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L. Terhadap <i>S. sanguinis</i> .....	84

Gambar 4.10. Alur Kerja Tes Sensitivitas.....	85
Gambar 4.11. Alur Proses Uji Toksisitas Akut.....	87
Gambar 4.12. Alur Uji Sitotoksisitas .....	99
Gambar 4.13. Alur Pengenceran Bakteri Dengan <i>Serial Dilution</i> .....	101
Gambar 4.14. Alur Uji <i>Biofim</i> .....	105
Gambar 5.1. Grafik Rerata Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H.sabdariffa</i> L.Terhadap <i>S. sanguinis</i> .....	110
Gambar 5.2. Secara Makroskopis Tampak Warna dan Bentuk Organ Tidak Ada kelainan.....	113
Gambar 5.3. Perkembangan Berat Badan Tikus Pada Kelompok Kontrol.....	118
Gambar 5.4. Perkembangan Berat Badan Tikus Pada Kelompok 1,25 mg/kg.....	117
Gambar 5.5. Perkembangan Berat Badan Tikus Pada Kelompok 2,5mg/kg.....	118
Gambar 5.6. Perkembangan Berat Badan Tikus Pada Kelompok 5 mg/kg.....	118
Gambar 5.7. Gambaran Mikroskopis Organ Hati Tikus Jantan dan Betina .....	126
Gambar 5.8. Gambaran Mikroskopis Organ Ginjal Tikus Jantan dan Betina.....	128
Gambar 5.9. Grafik Viabilitas (%) Sel Epitel Setelah Dipapar Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L. selama 24 jam.....	128
Gambar 5.10. Gambaran Mikroskopis Sel Epitel.....	130
Gambar 5.11. Grafik Viabilitas (%) Sel Fibroblast Setelah Dipapar Ekstrak Etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> L.....	131
Gambar 5.12. Gambaran Mikroskopis Sel Fibroblast.....	133
Gambar 5.13. Hasil Biakan <i>S. sanguinis</i> pada konsentrasi $10^{-5}$ dan $10^{-6}$ .....	134
Gambar 5.14. Potensi Pertumbuhan <i>S. sanguinis</i> dalam Fase <i>Adherence Biofilm</i> (20 jam) Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan.....	136



## DAFTAR SINGKATAN

ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
BHA	: <i>Brain Heart Agar</i>
BHI	: <i>Brain Heart Infusion</i>
C	: <i>Celcius</i>
CFU	: <i>Colony Form Unit</i>
CO <sub>2</sub>	: Karbondioksida
CMC	: <i>Carboxy methyl cellulose</i>
DepKes	: Departemen Kesehatan
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle medium</i>
DMSO	: <i>Dimethyl sulfoxide</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
g/L	: Gram per liter
g/dL	: <i>Gram per desiliter</i>
g/kgBB	: Gram per kilo Gram Berat Badan
GFR	: <i>Glomerular Filtration Rate</i>
Hb	: Hemoglobin
<i>H.sabdariffa</i> L.	: <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrogen peroksida
<i>H.sabdariffa</i> L.	: <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn
HNO <sub>3</sub>	: Asam nitrat
HCl	: Hidrogen klorida
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Asam sulfat
HE	: Hematoksin-Eosin
IL-1	: Interleukin-1
IU/L	: <i>International Units per Liter</i>
IFCC	: <i>International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine</i>
KHM	: Kadar Hambat Minimal
KBM	: Kadar Bunuh Minimal
KLH	: Klorheksidin

LDL	: <i>Low Density Lipoprotein</i>
LD <sub>50</sub>	: <i>Lethal Dose 50</i>
mm	: <i>Milimeter</i>
mmol/L	: <i>Millimoles/liter</i>
MTT	: <i>Dimethylthiazol diphenyltetrazolium</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NaCl	: <i>Natrium klorida</i>
NHANES	: <i>National Heath and Nutrition Examination Survey</i>
NOEL	: <i>No Observed Effect Level</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
POM	: <i>Pengawasan Obat dan Makanan</i>
Pelita	: <i>Pembangunan Lima Tahun</i>
PGE <sub>2</sub>	: <i>Prostaglandin E<sub>2</sub></i>
PCA	: <i>Protocatechic acid</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
3R	: <i>Refinement, Reduction, Replacement</i>
rpm	: <i>Rotations per minute</i>
SUSENAS	: <i>Survey Sosial Ekonomi Nasional</i>
SKRT	: <i>Survey Kesehatan Rumah Tangga</i>
<i>S.sanguinis</i>	: <i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>S. mutans</i>	: <i>Streptococcus mutans</i>
SKN	: <i>Sistem Kesehatan Nasional</i>
SD	: <i>Standar deviasi</i>
SGOT (ASAT)	: <i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (Aspartate Aminotransferase)</i>
SGPT (ALAT)	: <i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase (Alanine Aminotransferase)</i>
TNF	: <i>Tumor Necrotizing Factor</i>
Vit	: <i>Vitamin</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Surat Keterangan Lolos Etik.....	176
Lampiran 2	Hasil Identifikasi/determinasi Tumbuhan.....	177
Lampiran 3	Hasil Uji Fitokimia.....	178
Lampiran 4	Parameter Standar.....	179



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Gingivitis atau peradangan gingiva merupakan awal dari penyakit periodontal atau periodontitis yang sering ditemukan dalam rongga mulut dan dapat terjadi pada semua kelompok umur.<sup>1,2,3</sup> Menurut profil penyakit gigi dan mulut di Indonesia (1992), penyakit periodontal menempati urutan kedua yang diderita masyarakat setelah penyakit karies, dengan prevalensi 24,8%.<sup>4</sup> Menurut profil penyakit gigi dan mulut di Indonesia (1992), penyakit periodontal menempati urutan kedua yang diderita masyarakat setelah penyakit karies, dengan prevalensi 24,8%.<sup>4</sup>

Prevalensi penyakit periodontal pada pasien di 9 propinsi pada Pelita III adalah 63.59% dan pada Pelita IV adalah 77%. Angka tersebut terlihat sangat tinggi pada kelompok usia 35-44 tahun yaitu 73,42% dengan rata-rata 2.62 sektan kelainan periodontal pada pelita III dan 88.87% dengan rata-rata 3.03 sektan kelainan periodontal pada Pelita IV.<sup>5</sup> Pada studi morbiditas Susenas 2001, penyakit gigi dan mulut masuk ke dalam 10 kelompok penyakit terbanyak di Indonesia dengan prevalensi 61%.<sup>6,7</sup> Pada pertemuan para ahli periodontologi Asia Pasifik (1990) dilaporkan bahwa tidak ada perbedaan prevalensi penyakit periodontal antara daerah Asia pasifik dengan bagian lain di dunia.<sup>8,9,10</sup>

Data Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT 2004) menunjukkan bahwa 39% penduduk Indonesia mempunyai masalah gigi dan mulut. Penduduk dengan kehilangan seluruh gigi pada kelompok usia 65 tahun atau lebih sebanyak 30%, pada kelompok 55-64 tahun sebanyak 18% dan kelompok 45-54 tahun sebanyak 7%. Penyebab kehilangan tersebut karena karies dan penyakit periodontal.<sup>11</sup>

Hasil survei nasional kesehatan mulut di USA tahun 1985-1986, melaporkan bahwa 80% pria dan 73% wanita kelompok usia 18-64 tahun, mempunyai sedikitnya satu gigi dengan kehilangan tulang sebesar 98%, sedangkan pada kelompok usia 65-80 tahun sebanyak 94%.<sup>1,2</sup>

Gingivitis atau peradangan gingiva umumnya bersifat kronis dan sering ditemukan di negara-negara berkembang. Prevalensi penderita gingivitis di Indonesia berdasarkan indeks kalkulus mencapai 45,8% di daerah pedesaan dan 38,4% di daerah

urban, serta meningkat dengan bertambahnya umur.<sup>12</sup> Gingivitis merupakan penyakit periodontal tahap awal yang merupakan respon inang terhadap bakteri plak.<sup>13</sup> Gambaran klinis berupa hilangnya perlekatan gingiva secara klinis, gingiva kemerahan, udem, mudah berdarah pada probing. Bila keadaan tersebut tidak dilakukan perawatan maka dapat berkembang menjadi periodontitis kronis. Periodontitis kronis sering dikaitkan dengan *periodontal medicine*, yang dari hasil penelitian beberapa dekade terakhir ini dikaitkan dengan beberapa penyakit sistemik antara lain penyakit kardiovaskular, stroke, diabetes melitus, kelahiran bayi prematur, osteoporosis, dan bayi dengan berat lahir rendah.<sup>13,14</sup> dari hasil berbagai penelitian yang mengkaitkan periodontitis dengan penyakit sistemik tersebut, akhirnya istilah *Periodontal Medicine* dikembangkan. Dengan demikian gingivitis dapat dikategorikan pada peradangan gingiva yang penting untuk diperhatikan.

Studi epidemiologi di Indonesia yang telah dilakukan oleh Prayitno (1992), yang membandingkan kesehatan jaringan periodontal dari dua kelompok subyek yang terdiri dari 747 mahasiswa dan 592 pemetik teh usia dewasa muda menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna dari skor gingivitis. Prevalensi gingivitis pada mahasiswa mencapai 35,7% dan pada pemetik teh 72,6%.<sup>8</sup> Hasil survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001 menunjukkan bahwa 60% masyarakat Indonesia menderita sakit gigi dan mulut, dan ditemukan hampir 46% penduduk mempunyai karang gigi.<sup>7</sup>

Menurut data *The Third National Health and Nutrition Examination Survei* (NHANES III, 1988-94), ditemukan bahwa 50% orang dewasa mempunyai gingivitis paling sedikit pada 3-4 gigi.<sup>14</sup> Bergenholtz (1990) menyatakan bahwa prevalensi gingivitis mencapai 100% pada populasi yang tidak menjaga kebersihan gigi dan mulut dan menurun seiring dengan peningkatan *oral hygiene*.<sup>1</sup> Inflamasi gingiva merupakan penyakit dengan prevalensi terbesar di USA yaitu 70% pada anak-anak dan hampir 100% pada orang dewasa,<sup>3</sup> padahal target pencapaian kesehatan mulut tahun 2010 menurut WHO adalah penduduk pada umur 35-44 tahun dengan poket dalam adalah  $\leq 0,1$  sektan dan umur 65-74 tahun adalah  $\leq 0,5$  sektan.<sup>15</sup>

Beberapa penelitian epidemiologis menunjukkan adanya hubungan langsung antara deposit plak dan keparahan gingivitis. Gingivitis pada tahap awal bersifat *reversibel*, dapat sembuh dengan sendirinya atau bila dilakukan perawatan, tetapi jika tidak mendapat perawatan yang memadai maka proses patologisnya dapat



berlanjut ke jaringan penyangga yang lebih dalam menjadi periodontitis, selanjutnya, jika jaringan pendukung gigi mengalami kerusakan, maka gigi akan kehilangan jaringan penyangganya, goyang dan berakibat lepasnya gigi tersebut.<sup>16,17,18</sup>

Penyebab utama gingivitis adalah plak gigi atau *biofilm* merupakan substansi yang berstruktur lunak, berwarna kuning keabu-abuan dan melekat erat pada permukaan gigi. Di dalam plak terkandung makrofag, leukosit, enzim, komponen anorganik, matriks ekstraseluler, epitel deskuamasi, sisa-sisa makanan serta bakteri yang melekat pada gigi. Proses terjadinya gingivitis dimulai dari kolonisasi *S. sanguinis* pada permukaan gigi.<sup>19,20</sup> *S. sanguinis* merupakan spesies dominan dalam plak.<sup>21</sup> Urutan bakteri yang melakukan perlekatan pada pembentukan plak gigi untuk membentuk koloni adalah *S. sanguinis*, kemudian diikuti *S. oralis*, *S. gordonii* dan *S. mitis*, diikuti oleh *Lactobacilli* dan *S. mutans*.<sup>22</sup>

Pembentukan plak supragingiva dipelopori oleh bakteri yang mempunyai kemampuan untuk membentuk polisakarida ekstraseluler yang memungkinkan bakteri melekat pada gigi dan saling berhubungan.<sup>22</sup> Koloni bakteri tersebut antara lain *S. sanguinis*, *S. mitior*, *Actinomyces viscosus* dan *Actinomyces naeshundii*. Bila bakteri ini dibiarkan berkembang biak selama beberapa hari, akan timbul inflamasi gingiva.<sup>23,24</sup> Spesies bakteri yang dominan pada plak gigi adalah *S. sanguinis* dan *S. mutans*. *S. mutans* berperan pada karies, sedangkan *S. sanguinis* ditemukan baik pada plak, karies, gingivitis serta periodontitis, dan dapat menjadi ajang perlekatan mikroorganisme lain yang lebih patogen.<sup>25</sup> Hal tersebut dimungkinkan karena bakteri tersebut memiliki kemampuan melakukan agregasi segera setelah gigi dibersihkan, dan menghasilkan *neuraminidase* yang berperan dalam pembentukan plak.<sup>26</sup>

Hasil penelitian yang dilakukan Kriswandini melaporkan bahwa bakteri *S. sanguinis* sebagai fasilitator *S. mutans* yang berperan dalam patogenesis karies gigi.<sup>26</sup> Hal ini didukung oleh penelitian Rosan, yang melaporkan bahwa *S. sanguinis* mempunyai kekuatan melekat pada pelikel gigi sepuluh kali lebih kuat dibanding *S. mutans*<sup>27</sup>, terutama bila pelikel tersebut merupakan protein saliva yang terabsorpsi pada permukaan gigi.<sup>28</sup> Suatu penelitian mengenai bakteri endokarditis pada kelinci, melaporkan bahwa glukan ekstraseluler yang dihasilkan oleh *S. sanguinis* merupakan faktor virulen dan penyebab dari *sub bacterial endocarditis*.<sup>20,29</sup>

Pengaruh negatif plak terhadap gigi dan jaringan penyangga dapat dikurangi atau diminimalkan jika plak tersebut dibersihkan secara mekanis dengan sikat gigi,

benang gigi, sikat interdental serta obat kumur. Pemakaian obat kumur sebagai antiseptik diperlukan untuk membantu menghilangkan peradangan dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri dan menurunkan konsentrasi bakteri pada plak gigi.<sup>15,30</sup> Penggunaan obat kumur yang mengandung antiseptik pada penderita gingivitis terbukti dapat mengurangi kedalaman poket, mengurangi jumlah bakteri patogen, dan menunjang keberhasilan perawatan yang optimal.<sup>15,31</sup>

Pada umumnya penggunaan obat kumur sebagai antiseptik bertujuan untuk mengurangi dan mencegah peradangan gingiva. Klorheksidin adalah salah satu obat kumur yang sampai saat ini dianggap sebagai *gold standard* dalam perawatan penyakit periodontal.<sup>23</sup> Hal ini diperkuat dengan penelitian Marsh dan Martin (2009) yang menyatakan bahwa klorheksidin efektif terhadap *biofilm S. sanguinis* pada 10-50x kadar hambat minimal (KHM),<sup>23</sup> namun klorheksidin memiliki beberapa efek samping antara lain dapat menyebabkan pewarnaan ekstrinsik pada gigi dan lidah, rasa tidak enak, gangguan pengecap, rasa sakit dan iritasi pada mukosa mulut karena mengandung alkohol.<sup>32</sup> Pengamatan klinis telah dilakukan terhadap khasiat antibakteri obat kumur yang tidak mengandung alkohol, seperti obat kumur yang mengandung *amine fluoride* atau *stannous fluoride* serta obat kumur yang mengandung triclosan dibandingkan klorheksidin dan *placebo*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa larutan obat kumur yang tidak mengandung alkohol juga efektif untuk mengurangi akumulasi plak dan hasilnya sama baiknya dibanding obat kumur yang mengandung alkohol.<sup>33</sup> Adanya dampak negatif alkohol terhadap jaringan lunak mulut dan bersifat iritan, menyebabkan dikembangkan suatu formula obat kumur yang tidak mengandung alkohol menjadi satu hal yang penting untuk mendapatkan obat kumur berkhasiat dengan efek samping minimal.

Saat ini banyak dikembangkan obat kumur dengan bahan dasar tanaman obat yang diyakini mempunyai khasiat antibakteri dengan efek samping minimal, walaupun hal tersebut masih memerlukan pembuktian ilmiah. Pengembangan tanaman obat tradisional di Indonesia didasari oleh keputusan Pemerintah Republik Indonesia dalam hal ini Departemen Kesehatan Republik Indonesia yaitu Undang-Undang no. 381 tahun 2007 tentang Kebijakan Obat Tradisional. Di dalam salah satu subsistem Sistem Kesehatan Nasional (SKN) disebutkan bahwa pengembangan dan peningkatan obat tradisional ditujukan agar diperoleh obat tradisional terstandar yang bermutu tinggi, aman, memiliki khasiat nyata yang teruji secara ilmiah, dapat

dimanfaatkan secara luas, baik untuk pengobatan sendiri oleh masyarakat maupun digunakan untuk pelayanan kesehatan formal. Undang-undang tersebut dibuat berdasarkan fakta bahwa obat dan biaya untuk memulihkan dan mempertahankan kesehatan masih relatif mahal. Oleh karena itu sebagian orang mengalihkan perhatiannya pada terapi infeksi dengan menggunakan obat tradisional yang diyakini mempunyai khasiat sebagai antibakteri.<sup>34</sup>

Komponen antibakteri yang berasal dari tanaman obat sudah banyak digunakan sebagai pengobatan berbagai penyakit infeksi. Bahan yang berasal dari tanaman juga telah digunakan untuk penyakit periodontal, dan pemeliharaan kebersihan mulut.<sup>35</sup> Beberapa jenis tanaman telah dievaluasi kemungkinan penggunaannya dalam pengobatan modern, sebagian besar tanaman yang berpotensi untuk pengobatan lainnya belum dilakukan pengujian.<sup>35</sup> Obat kumur berasal dari tanaman obat seperti campuran sirih dan saga telah dibuktikan dapat menghambat aktivitas mikrobial *S. mutans*, *S. sanguinis*, dan *A. viscosus*. Hasil uji *in vitro* menghasilkan zona hambatan yang dihasilkan obat kumur herbal lebih besar dibandingkan dengan obat kumur yang beredar di pasaran yang memiliki kandungan *menthol*, *thymol*, *methyl salicylate* dan *eucalyptol* dan klorheksidin.<sup>36</sup> Hasil penelitian Zubardiah (2009) membuktikan bahwa ekstrak daun *Lawsonia inermis* L. mengandung golongan senyawa antibakteri, tidak sitotoksik terhadap sel fibroblast gingiva manusia, dan dapat menyembuhkan gingivitis dengan tanda klinis menurunkan *plaque index*, *papilla bleeding index*, dan lebih baik dari obat kumur *hexetidine* 0.1%.<sup>37</sup>

Pengembangan tanaman obat menjadi obat terstandar untuk mencari obat-obat baru dari tanaman obat dengan sumber yang banyak di Indonesia, diharapkan lebih aman karena sudah dipergunakan secara empiris. Tanaman obat sudah dikenal dan digunakan di seluruh dunia sejak beribu tahun yang lalu.<sup>38</sup> Organisasi Kesehatan dunia (WHO) pada tahun 2008 mengestimasi bahwa hampir 80% penduduk dunia menggunakan obat dari bahan alam untuk mendukung kesehatan.<sup>39,40</sup> Alam Indonesia mempunyai potensi yang besar dalam pengembangan obat dari bahan alam atau dari tanaman obat yang digunakan sebagai obat tradisional. Penggunaan obat alami di Indonesia yang dikenal sebagai jamu, telah dimanfaatkan sejak zaman nenek moyang hingga kini dan terus dilestarikan sebagai warisan budaya Indonesia yang dianugerahi kekayaan keanekaragaman hayati tersebut, memiliki lebih dari 30.000

jenis tanaman. Hingga saat ini, tercatat 7.000 spesies tanaman telah diketahui khasiatnya, namun baru kurang dari 300 tanaman yang digunakan sebagai bahan baku industri farmasi secara regular.<sup>40,41,42</sup>

Di Indonesia pemanfaatan obat dari bahan alam dianjurkan kepada masyarakat sebagai alternatif pengganti obat paten karena Indonesia termasuk salah satu negara yang memiliki banyak tanaman obat potensial. Diperkirakan lebih dari 70% tanaman obat yang tumbuh di Asia ada di Indonesia. Hal ini berarti jumlahnya sangat besar. Alasan lain karena masyarakat Indonesia secara turun temurun telah menggunakan tanaman obat sebagai salah satu cara dalam swa pengobatan dan memelihara kesehatan.<sup>43</sup>

Menurut WHO, Obat tradisional adalah obat-obatan yang berasal dari bahan-bahan atau tumbuhan alami yang diolah secara tradisional, turun-temurun, berdasarkan resep nenek moyang, adat-istiadat, kepercayaan, atau kebiasaan setempat, baik bersifat magis maupun berasal dari pengetahuan tradisional,<sup>43</sup> namun sampai saat ini obat tradisional belum terangkat derajatnya dibandingkan dengan obat modern. Adapun penyebabnya antara lain dunia kedokteran Indonesia cenderung berorientasi pada dunia medik Barat dan belum sepenuhnya menerima obat tradisional. Penyebab lain adalah masih minimnya penelitian ilmiah untuk membuktikan khasiat klinis, mutu dan keamanan obat tradisional.<sup>43</sup>

Pada umumnya efektivitas dan keamanan obat tradisional belum sepenuhnya didukung oleh data ilmiah yang baik.<sup>44</sup> Landasan ilmiah seperti faktor keamanan, hubungan efek dan dosis dan sediaan yang sesuai penggunaannya diperlukan dalam tahap pengembangan tanaman obat menjadi suatu obat fitofarmaka. Tanaman obat mengalami serangkaian pengujian *in vitro* dan *in vivo* pada hewan coba.<sup>44</sup> Saat ini obat tradisional dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu jamu (*empirical based herbal medicine*), obat herbal terstandar (*scientific based herbal medicine*) dan fitofarmaka (*clinical based herbal medicine*).<sup>44,45</sup> Pengembangan suatu tanaman obat menjadi fitofarmaka harus melewati tahap obat herbal terstandar, melalui beberapa tahap uji baku yang telah ditetapkan oleh Departemen Kesehatan RI. Pada awalnya dilakukan uji identifikasi dan deteksi komponen-komponen senyawa kimia yang terdapat pada tanaman obat tersebut, lalu dilanjutkan uji daya anti bakteri untuk mendapatkan kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM), selanjutnya dilakukan tahap uji toksisitas tanaman obat pada hewan coba baik akut

dan subkronis. Semua tahap ini harus dilakukan agar didapatkan pengobatan yang tepat, rasional dan aman.<sup>44</sup>

Penggunaan obat topikal yang bersifat antibakteri digunakan sebagai terapi penunjang penyakit periodontal. Obat dari bahan alam atau tanaman obat diyakini lebih aman daripada obat dari bahan kimia, walaupun hal tersebut masih perlu pembuktian secara ilmiah,<sup>44</sup> salah satunya adalah kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. Infusa kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. dilaporkan berkhasiat sebagai antiinflamasi<sup>46</sup>, antiseptik, antibakteri<sup>39</sup>, astringent, analgetik, memperlancar peristaltik usus<sup>47,48</sup> dan antipiretik<sup>49,50</sup>. Tanaman tersebut diindikasikan untuk pengobatan abses<sup>48</sup>, anti kanker<sup>46,51</sup>, anti tumor, anti leukemik, *immune-modulating*<sup>51</sup>, batuk, demam, menurunkan tekanan darah, mengurangi kekentalan atau viskositas darah<sup>48,51</sup>, neurosis, antioksidan tinggi<sup>46,48,50</sup>, peluruh kencing (diuretik), merangsang keluarnya empedu dari hati (*choleretic*), menurunkan kolesterol<sup>49,51,53</sup>, asam urat, sitrat, tartrat, trigliserida dalam urine, anti kejang (spasmolitik), cacingan antelmintik.<sup>54</sup>

Kelopak bunga *H. sabdariffa* L. memiliki berbagai khasiat tersebut di atas karena kandungan bahan aktif yang dimilikinya. Berbagai kandungan zat tersebut antara lain flavonoid, fenol atau polifenol (*anthocyanin-delphinidin-3-glucosyl-xyloside (hibiscin)* dan *cyanidin-3-glucosyl-xyloside*<sup>50,52</sup>, asam sitrat, saponin<sup>39</sup>, tanin, *cyanogenic glycoside*, antioksidan seperti *gossyptin*, *anthocyanin*, *glucide hibiscin*, vitamin A, vitamin B, vitamin C kadar tinggi, kalsium, pospor, zat besi, niasin, karoten, *theaflavins* dan *catechin* dan 18 macam asam amino, salah satunya *arginin* berfungsi untuk peremajaan sel tubuh.<sup>39</sup> Flavonoid berfungsi menghambat pertumbuhan mikroorganisme karena mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen. Polifenol atau fenol berfungsi sebagai antibakteri dengan cara mendenaturasi protein sel dan merusak membran plasma bakteri. Asam sitrat membantu meningkatkan aliran darah ke permukaan kulit. Antioksidan berfungsi menangkal radikal bebas. Vitamin C membantu penyerapan semua vitamin dan mineral sehingga membantu metabolisme tubuh.<sup>55</sup>

Penelitian mengenai antibakteri penyebab TBC telah dilakukan oleh Kirdpon dkk (1994), yang menyatakan bahwa ekstrak air dan zat warna yang terkandung dalam *H. sabdariffa* L mempunyai efek letal terhadap *Mycobacterium tuberculosis*,<sup>54</sup> penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa ekstrak air *H. sabdariffa* L. mempunyai

efek antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophilia* (bakteri gram negatif) dan *Streptococcus agalactiae* (bakteri gram positif).<sup>56</sup> Dari penelitian-penelitian yang pernah dilakukan, sampai saat ini belum ada penelitian mengenai penggunaan ekstrak *H. sabdariffa* L. sebagai antiseptik dalam bidang kedokteran gigi, khususnya pada bidang periodontologi misalnya sebagai terapi penunjang terhadap gingivitis.

Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan penulis menunjukkan bahwa infusa kelopak bunga *H. sabdariffa* L. menunjukkan aktifitas antibakteri terhadap *S. sanguinis* berdasarkan uji kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM),<sup>57</sup> akan tetapi masih perlu penelitian apakah infusa kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai potensi dalam menghambat pertumbuhan *biofilm* oleh *S. sanguinis*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Gingivitis merupakan salah satu penyakit periodontal berupa peradangan pada gingiva, umumnya bersifat kronis, dan disebabkan oleh bakteri plak. Bakteri plak merupakan massa bakteri yang membentuk *oral biofilm*. Gambaran klinis gingivitis berupa hilangnya perlekatan gingiva secara klinis, gingiva berwarna kemerahan, udem, mudah berdarah pada probing. Gingivitis yang tidak dilakukan perawatan dapat berkembang menjadi periodontitis kronis. Periodontitis kronis sering dikaitkan *periodontal medicine*, berbagai kondisi sistemik dapat meningkatkan kerentanan penyakit periodontal, dan adanya infeksi periodontal dapat menjadi faktor resiko kondisi sistemik. Adapun kondisi sistemik tersebut antara lain penyakit kardiovaskular, stroke, diabetes melitus, kelahiran bayi prematur, osteoporosis.<sup>13,14</sup>

Pada umumnya terapi lokal terhadap gingivitis berupa kontrol plak, skeling dan penghalusan akar, dan pemberian terapi penunjang seperti obat kumur. Obat kumur seperti klorheksidin dianggap sebagai *gold standar* dalam perawatan periodontal<sup>23,32</sup>, namun produk ini memiliki efek samping seperti pewarnaan ekstrinsik pada gigi dan lidah, rasa tidak enak, gangguan pengecap, iritasi pada mukosa mulut karena mengandung alkohol,<sup>23,32</sup> sehingga perlu dicari bahan alternatif, namun tetap memiliki efektifitas yang sama dengan *gold standar*.

Salah satu tanaman obat yang akan diteliti adalah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Sampai saat ini belum ada penelitian mengenai pemanfaatan

kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam bidang kedokteran gigi khususnya periodontologi. Salah satu khasiat kelopak bunga *H. sabdariffa* L. adalah sebagai antibakteri. Penelitian antibakteri kelopak bunga *H. sabdariffa* L. telah dilakukan pd *M. tuberculosis*, *A. hydrophilia*, dan *S. agalactiae*.<sup>53,5</sup> Penelitian pendahuluan menunjukkan infusum *H. sabdariffa* L. mempunyai aktifitas antibakteri terhadap *Streptococcus sanguinis* sebagai penyebab utama gingivitis pada uji kadar hambat minimal (KHM) dan uji bunuh minimal (KBM).<sup>57</sup>

Berdasarkan latar belakang dan rumusan permasalahan yang telah diuraikan, maka dapat dituangkan pertanyaan penelitian, sebagai berikut :

- 1.2.1 Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung golongan senyawa aktif yang bersifat antibakteri?
- 1.2.2 Apakah parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat ditetapkan?
- 1.2.3 Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai efek antibakteri terhadap *S. sanguinis* ?
- 1.2.4 Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. bersifat aman dalam untuk digunakan dalam jangka waktu pendek (toksisitas akut) ?
- 1.2.5 Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. bersifat aman dalam untuk digunakan dalam jangka waktu panjang (toksisitas subkronis) ?
- 1.2.6 Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak bersifat toksik terhadap sel epitel dan fibroblast?
- 1.2.7 Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm* secara *in vitro*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Menetapkan adanya golongan senyawa antibakteri pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.
- 1.3.2 Menetapkan parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.
- 1.3.3 Menganalisis daya antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan menggunakan uji kadar hambat minimal (KHM), kadar bunuh minimal (KBM) dan zona hambat terhadap *S. sanguinis*.

- 1.3.4 Menganalisis efek toksik ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap organ vital tikus berdasarkan uji toksisitas akut.
- 1.3.5 Menganalisis efek toksik penggunaan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap organ vital tikus berdasarkan uji toksisitas subkronis.
- 1.3.6 Menganalisis efek toksik ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap sel epitel dan fibroblast berdasarkan uji sitotoksitas (*MTT assay*).
- 1.3.7 Menganalisis efektivitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sebagai antibakteri terhadap potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm* secara *in vitro*

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

- 1.4.1 Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendukung program pemerintah dalam pengembangan tanaman obat menjadi obat herbal terstandar.
- 1.4.2 Memberikan manfaat penelitian yaitu dengan diketahuinya dosis efektif, parameter standar serta keamanan dari ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. serta efektivitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sebagai antibakteri.
- 1.4.3 Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sebagai bahan alternatif terapi penunjang gingivitis.

Dari uraian manfaat penelitian di atas, maka hasil penelitian akan dipublikasikan secara internasional dan potensi Hak Atas Kekayaan Intelektual (HAKI) yang hendak didaftarkan atas nama Universitas Indonesia adalah sebagai berikut :

1. Penetapan parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. meliputi susut pengeringan, bobot jenis, kadar air dan kadar abu.
2. Daya antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. melalui uji KHM, KBM dan zona hambat.



3. Penetapan LD<sub>50</sub> ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.
4. Penetapan NOEL ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.
5. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman dan tidak toksik terhadap sel epitel dan fibroblast.
6. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam biofilm secara in vitro.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Gingivitis

Penyakit Periodontal merupakan salah satu penyakit yang banyak ditemukan dalam masyarakat dan kebanyakan masyarakat menerima keadaan ini sebagai suatu hal yang biasa, tidak dapat dihindari sehingga tidak ada usaha ke arah pencegahan maupun perawatan. Beberapa studi etiologi mengenai pencegahan dan perawatan penyakit periodontal menunjukkan bahwa dapat dilakukan pencegahan pada penyakit periodontal. Penyakit periodontal terdiri dari gingivitis dan periodontitis. Gingivitis adalah peradangan yang terjadi pada gingiva dan bersifat *reversible*, yaitu jaringan gingiva dapat kembali normal apabila dilakukan pembersihan plak gigi dengan sikat gigi secara teratur, sedangkan periodontitis merupakan peradangan gingiva yang sudah berlanjut ke jaringan pendukung lebih dalam dan bersifat *irreversible*, biasa dijumpai pada usia 30-40 tahun. Apabila tidak dirawat dapat menyebabkan kehilangan gigi.<sup>58,59</sup>

Menurut data epidemiologi, gingivitis sangat berhubungan dengan periodontitis. Gingivitis tidak selalu berkembang ke periodontitis inisial, akan tetapi gingivitis mendahului periodontitis.<sup>1,18</sup> Pada umumnya gambaran klinis gingivitis ditandai dengan gingiva yang berwarna kemerahan, pembengkakan dengan konsistensi lunak, interdental papil tumpul, kecenderungan berdarah pada tekanan ringan, serta terdapat plak dan kalkulus. Pemeriksaan histopatologis pada gingivitis menunjukkan adanya ulserasi epitel. Keberadaan mediator radang dapat mengurangi fungsi epitel sebagai pelindung sel. Perbaikan epitel yang mengalami ulserasi tergantung pada aktivitas proliferasi atau regenerasi sel-sel epitel.<sup>60</sup>

Gingivitis dapat terjadi dengan cepat dan dalam waktu pendek, dapat disertai rasa sakit. Kondisi yang lebih ringan juga dapat terjadi pada tahap ini. Gingivitis dapat timbul kembali setelah perawatan atau hilang secara spontan. Gingivitis kronis terjadi dengan lambat dan dalam waktu panjang, tanpa disertai rasa sakit kecuali dengan komplikasi eksaserbasi akut atau subakut. Jenis gingivitis kronis ini paling sering dijumpai dan merupakan penyakit yang sering hilang timbul, peradangan dapat

menetap atau hilang, dan daerah yang sudah normal dapat mengalami peradangan kembali.<sup>61</sup>

Perubahan patologis pada gingivitis berkaitan dengan akumulasi mikroorganisme dalam plak, di dalam atau dekat sulkus gingiva. Mikroorganisme ini mampu mensintesis berbagai enzim seperti *collagenase*, *hyaluronidase*, *protease*, *chondroitin sulfate*, dan *endotoxin* yang mengakibatkan kerusakan sel-sel epitel dan jaringan ikat, demikian juga bahan-bahan interseluler seperti kolagen, substansi dasar, dan *glycocalyx* (pelapis sel). Pelebaran ruang yang terjadi di antara *junctional epithelium* selama gingivitis awal, memberi jalan untuk masuknya produk-produk mikroorganisme dan mikroorganisme menuju ke jaringan ikat.<sup>62</sup> Perkembangan gingivitis terjadi dalam 4 tahap yaitu lesi inisial, lesi awal, lesi menetap, dan lesi lanjut.<sup>63</sup>

Manifestasi awal peradangan gingiva adalah perubahan vaskular yang terdiri dari pelebaran kapiler dan penambahan aliran darah. Perubahan yang terjadi pada peradangan inisial merupakan respon aktivasi antimikrobial dari leukosit dan stimulasi sel-sel endotel. Respon awal gingiva terhadap bakteri secara klinis tidak tampak, dan umumnya disebut sebagai gingivitis subklinis.<sup>61</sup>

Tahap selanjutnya adalah lesi awal yang berkembang dari lesi inisial yaitu satu minggu setelah akumulasi plak yang secara klinis tampak sebagai gingivitis awal. Seiring dengan bertambahnya waktu, tampak tanda-tanda klinis gingivitis berupa eritema, terutama karena adanya proliferasi kapiler, dan penambahan *loop* kapiler di antara *retepegs* dan *ridges* serta terjadi perdarahan pada probing. Aliran cairan gingiva dan transmigrasi leukosit mencapai tingkatan maksimal antara 6 dan 12 hari setelah gingivitis tampak secara klinis.<sup>61</sup>

Tahap ketiga disebut lesi menetap, pada tahap ini pembuluh darah semakin membesar dan banyak, pembuluh balik vena dilatasi sehingga aliran darah menjadi lamban. Akibatnya terjadi anoksemia gingiva lokal, warna gingiva menjadi merah kebiruan. Pada lesi lanjut merupakan perluasan peradangan ke arah ligamentum periodontal dan tulang alveolar yaitu bagian jaringan periodonsium yang lebih dalam. Tahap ini disebut tahap kerusakan periodontal, yang ditandai terbentuknya poket periodontal dan resorpsi tulang alveolar. Hal ini terjadi karena adanya mediator peradangan sebagai respon inang yang terlibat dalam kerusakan jaringan yaitu sitokin

(*interleukin-1* atau IL-1) dan *tumor necrotizing factor* atau TNF, prostaglandin E2 (PGE2) serta proteinase (*matrix metalloproteinase* atau MMP).<sup>61</sup>

Perawatan gingivitis kronis ditujukan untuk mengeliminasi bakteri plak sebagai etiologi utama. Pada gingivitis ringan dapat dilakukan dengan melakukan kontrol plak yang baik, melalui eliminasi plak menggunakan berbagai alat pembersih secara mekanis<sup>61</sup> serta penggunaan bahan antibakteri secara lokal atau topikal untuk membantu mengurangi bakteri dalam plak.<sup>63</sup>

Perawatan gingivitis perlu mendapat perhatian khusus, mengingat gingivitis yang tidak dilakukan perawatan dapat berlanjut menjadi periodontitis, yang berkaitan erat dengan *periodontal medicine*. Berbagai penelitian terakhir menunjukkan bahwa bakteri yang terdapat dalam gingivitis dapat memicu penggumpalan darah yang dapat mendorong serangan jantung atau *stroke*. Mikroorganisme yang terdapat di dalam jaringan periodonsium juga berkaitan dengan perkembangan penyakit sistemik seperti penyakit jantung koroner, atherosklerosis dan *pre-eclampsia*, kelahiran bayi prematur<sup>64,65</sup>

### 2.1.1 Plak Gigi atau Biofilm Rongga Mulut

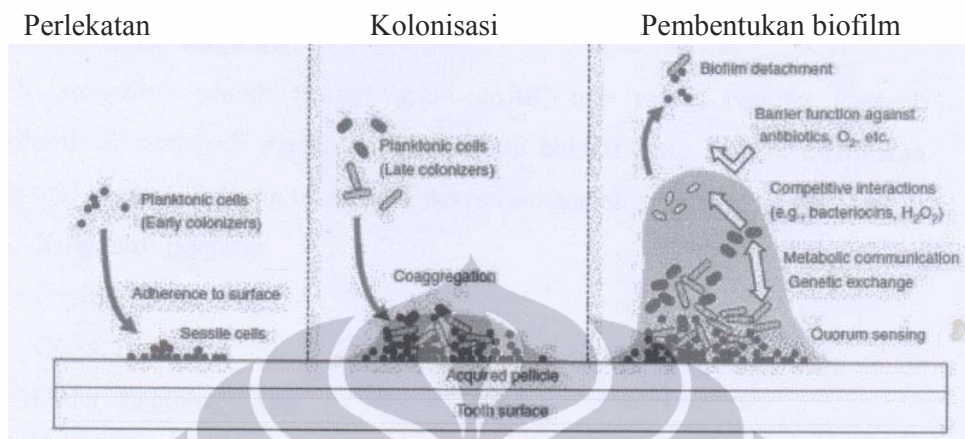
Plak gigi atau disebut juga biofilm rongga mulut, dikenal sebagai faktor kunci etiologi karies dan penyakit periodontal.<sup>66</sup> Plak gigi didefinisikan secara klinis sebagai suatu struktur yang lentur berwarna kuning keabu-abuan, melekat erat pada permukaan gigi atau bahan restorasi gigi, implan atau restorasi cekat maupun lepas, dimulai segera setelah berkontak dengan lingkungan mulut. Dalam proses pembentukan plak, kolonisasi bakteri awal dilakukan oleh *S. sanguinis*, yang berikatan dengan permukaan gigi yang dilapisi saliva.<sup>19,23,67</sup> Perlekatan *S. sanguinis* merupakan langkah awal penting dalam pembentukan biofilm, yang berpengaruh pada komposisi plak yang matang.<sup>67</sup> Plak gigi merupakan mikrobial biofilm yang kompleks, lebih besar dari  $10^{10}$  bakteri per milligram, yang terdiri dari berbagai spesies bakteri (60-70% dari volume plak) yang melekat pada permukaan gigi atau restorasi dan saling berinteraksi satu dengan yang lain. Selain bakteri, plak berisi sejumlah sel epitel, leukosit dan makrofag. Sel mengandung matrik ekstraseluler, yang dibentuk dari produk bakteri dan saliva. Di dalam matrik ekstraseluler terkandung protein, polisakarida dan lemak. Komponen inorganik plak terdiri dari sejumlah besar kalsium

dan fosfor yang berasal dari saliva. Selanjutnya komposisi dan aktivitas plak dipengaruhi oleh replikasi bakteri selama fase suplai nutrisi. *Streptococcus sanguinis* merupakan salah satu dari beberapa kolonisasi awal, dan memainkan peranan penting dalam tahap inisiasi pembentukan plak.<sup>67</sup>

Plak gigi terutama terdiri lebih dari 500 spesies mikroorganisme.<sup>68</sup> Mikroorganisme non-bakteri juga ditemukan dalam plak seperti spesies mikoplasma, ragi, protozoa, dan virus.<sup>69</sup> Plak gigi dapat diklasifikasikan berdasarkan hubungannya dengan margin gingiva yaitu plak supragingiva dan plak subgingiva. Plak supragingiva ditemukan pada gigi di atas margin gingiva, sedangkan plak subgingiva ditemukan di bawah margin gingiva.<sup>69</sup>

Pembentukan awal plak dimulai dari pembentukan pelikel. Pelikel gigi merupakan deposit transparan pada permukaan gigi yang terlihat ketika pasien menggunakan larutan *disclosing*. Segera setelah gigi dibersihkan secara cepat akan tertutup oleh glikoprotein saliva yang disebut pelikel. Pelikel berasal dari unsur pokok saliva yang secara selektif di *adsorpsi* pada permukaan gigi. Komponen pelikel terdiri dari *albumin*, *lysosome*, *α-amylase*, *immunoglobulin A*, *protein rich proline* dan *mucin*.<sup>70</sup>

Bakteri *planktonic* yang tidak mampu berkolonisasi langsung pada permukaan gigi dapat melekat pada permukaan kolonisasi awal (gambar 2.1.) Kolonisasi bakteri pelikel yang melekat pada permukaan gigi adalah bakteri Gram positif seperti *S. sanguinis*, *S. mutans* dan *A. viscosus*. Ketiga organisme ini disebut kolonisasi plak primer (*early colonizer*). Kolonisasi awal bakteri ini menjadi jembatan untuk kolonisasi selanjutnya ( antar sel koagregat yang berdekatan). Bakteri pada kolonisasi awal mampu menyerap nutrisi dari *protein rich proline* sekaligus memiliki reseptor untuk *adhesin* pada bakteri-bakteri *late colonizer*. Koagregasi adalah reaksi spesifik dari sel ke sel yang terjadi antara sel bakteri yang berbeda dan merupakan salah satu mekanisme paling penting yang mendasari kolonisasi bakteri dalam mulut dan pembentukan biofilm gigi (gambar 2.2.). Koagregasi bakteri terjadi pada *early colonizer* dan *late colonizer*.<sup>71</sup>



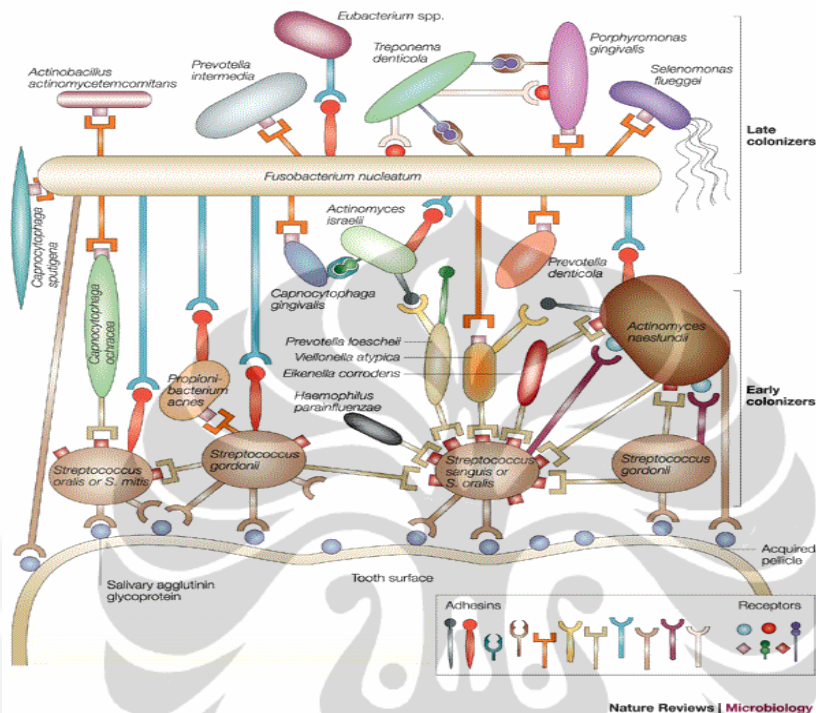
Gambar 2.1. Pembentukan Biofilm (Hojo 2009)<sup>72</sup>

Molekul permukaan bakteri yang berinteraksi dengan pelikel memungkinkan bakteri melekat atau menempel pada pelikel seperti molekul protein ditemukan pada bagian *fimbriae* pada *S. sanguinis* dan *A. viscosus*, berinteraksi dengan protein kaya prolin seperti mekanisme “lock and key” yang menghasilkan perlekatan kuat dari bakteri ke pelikel.<sup>70</sup>

Setelah kolonisasi inisial pada permukaan gigi, jumlah plak akan meningkat melalui 2 mekanisme berbeda yaitu: 1). multiplikasi bakteri yang sudah melekat pada permukaan gigi; 2) perlekatan selanjutnya dan multiplikasi dengan spesies bakteri baru ke sel bakteri yang sudah ada dalam plak. Kolonisasi sekunder meliputi Gram-negatif seperti *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* dan *Capnocytophaga*, dimana terjadinya perlekatan mikroorganisme pada Gram-positif yang sudah ada pada plak sebelumnya. Kolonisasi ini ditemukan 1-3 hari setelah akumulasi plak.<sup>70</sup>

Setelah 1 minggu akumulasi plak, Gram-negatif lain dapat berada dalam plak. Spesies tersebut digolongkan sebagai koloniser *tertiary*, yang meliputi *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, dan *Spirochaeta* (spesies *Treponema*). Karakteristik struktural plak pada periode ini menunjukkan pola kompleks dari sel bakteri *cocci*, *rods*, *fusiform*, *filamen* dan *spirochaeta*. Pada keadaan tertentu, secara

spesifik terlihat perbedaan bentuk bakteri seperti perlekatan *cocci* ke filamen sehingga dihasilkan bentuk ‘*test-tube brushes*’ atau ‘*corn-cob*’ arrays.<sup>23</sup>



Gambar 2.2. Interkomunikasi Bakteri Plak (Kuramitsu)<sup>66</sup>

Interaksi struktural bakteri memungkinkan menjadi refleksi interaksi metabolik kompleks yang dapat terjadi antara mikroorganisme plak yang berbeda, sebagai contoh produksi *succinic acid* dari *Campylobacter* digunakan untuk faktor pertumbuhan dari *Porphyromonas gingivalis*. *Streptococcus* dan *Actinomyces* menghasilkan *formate* yang digunakan untuk *Campylobacter*. *Fusobacterium* menghasilkan *thiamine* dan *isobutyrate* digunakan oleh *spirochaeta* untuk mendukung pertumbuhannya. Interaksi metabolik dan struktural antara mikroorganisme plak yang berbeda merupakan refleksi dari tempat ekologi yang kompleks.<sup>73</sup>

Pola keseluruhan perkembangan plak digambarkan perpindahan dari dominan awal Gram-positif fakultatif ke dominan lanjut Gram-negatif *anaerob*, sama seperti akumulasi plak dan pematangan plak. Perubahan ini dapat mencerminkan perpindahan mikroorganisme yang diobservasi dari keadaan sehat ke keadaan sakit.<sup>74</sup> Studi mikroskopis menunjukkan pada plak subgingiva yang matang terdapat perbedaan tipe bentuk (*cocci*, *rods*, *filamen*, *spirochaeta*). Peningkatan *motile*



*rods* dan *spirochaeta* terjadi pada gingivitis dan periodontitis dibandingkan pada gingiva sehat.<sup>72</sup> Persentase Gram-positif *rods* dan *cocci* menurun pada gingivitis dan periodontitis yang berhubungan dengan plak dibandingkan dalam keadaan sehat, persentase Gram-negatif *anaerob* meningkat pada gingivitis (lebih kurang 25%) dan periodontitis (lebih kurang 75%) dibandingkan keadaan sehat (lebih kurang 13%).<sup>75</sup>

Haake (2006) mengelompokkan bakteri yang berada di dalam plak berdasarkan morfologi dinding sel (Gram-positif, Gram-negatif atau *spirochaeta*) serta status fisiologik (fakultatif atau *anaerob*) dalam kelompok sebagai berikut: 1) Kelompok bakteri Gram-positif fakultatif yaitu *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, dan *Actinomyces viscosus*; 2) Kelompok bakteri Gram-negatif fakultatif yaitu *A. actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga species*, dan *Eikenella corrodens*; 3) Kelompok bakteri Gram-negatif anaerobik yaitu *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, dan *Campylobacter rectus*; dan 4) Kelompok *Spirochetes* yaitu *Treponema denticola* dan spesies *Treponema* lainnya (Tabel 2.1.)<sup>76</sup>

Tabel 2.1. Kumpulan Bakteri yang Ditemukan Dalam Plak

Spesies bakteri dalam plak gigi		
	Fakultatif	Anaerobik
Gram positif	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> <i>Actinomyces viscosus</i>	
Gram-negatif	<i>Aggreratibacter</i> <i>Actinomycetemcomitans</i> <i>Capnocytophaga species</i> <i>Eikenella corrodens</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Campylobacter rectus</i>
Spirochaeta		<i>Treponema denticola</i> (spesies <i>Treponema</i> lain)

Sumber : Haake SK. Microbiology of Dental Plaque. Available in URL : <http://www.dent.ucla.edu/pic/members/microbio/mdphome.html>. Accessed on 29 December 2009.<sup>76</sup>

Setelah terjadi kolonisasi, *biofilm* mulai mengalami maturasi dan pertumbuhannya melambat. Perlambatan pertumbuhan ini berpengaruh terhadap resistensi *biofilm* terhadap antimikroba. Adanya ekstraseluler matriks juga



menyebabkan *biofilm* lebih resisten terhadap antimikroba dibandingkan dengan bakteri *planktonic*.<sup>77</sup>

Adapun Fase pembentukan *biofilm* dapat dibagi menjadi tiga yaitu fase *adherence* (0-4 jam), fase akumulasi aktif (4-20 jam) dan fase *plateau accumulated* (setelah 20 jam).<sup>78</sup> Pada fase *adherence* ditemukan bakteri yang secara dominan melekat pada pelikel yaitu *Streptococci* (61-78%) seperti *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* dan *Streptococcus oralis* dan *Actinomyces* (4-30%).<sup>79</sup> Pada fase akumulasi, jumlah sel *biofilm* meningkat secara eksponensial karena terjadi akumulasi bakteri dan pertumbuhan yang cepat.<sup>80</sup> Berdasarkan penelitian, semua antibakteri akan efektif membunuh pada saat bakteri sedang mengalami pertumbuhan.<sup>81</sup> Selanjutnya lebih dari 20 jam, terjadi fase maturasi dimana pertumbuhan bakteri mulai melambat atau terhenti karena terbatasnya jumlah nutrisi.<sup>80</sup>

Berdasarkan resistensinya terhadap antibakteri, bakteri pada *biofilm* dapat 100 hingga 1000 kali lebih resisten dibandingkan dengan bakteri pada *planktonic*.<sup>77</sup> Pertama, ada kemungkinan bahwa matriks ekstraseluler yang melapisi *biofilm* membatasi difusi agen antimikroba. Kedua, pertumbuhan yang lambat dalam *biofilm* berkontribusi terhadap resistensi antibakteri. Ketiga, adanya faktor enzim yang dapat menginaktivkan antibakteri. Ketebalan *biofilm* juga mempengaruhi resistensi bakteri terhadap antibakteri. Semakin tebal *biofilm*, maka semakin sulit antibakteri berpenetrasi ke dalam *biofilm*.<sup>77</sup>

### 2.1.2 *Streptococcus sanguinis*

Kurang lebih 20% bakteri rongga mulut didominasi oleh *Streptococcus*.<sup>71</sup> *Streptococcus* merupakan pioner pembentukan plak gigi dan merupakan faktor krusial dalam pembentukan *oral biofilm*.<sup>23,67,76</sup> *Streptococcus sanguinis* (dulu disebut *Streptococcus sanguis*).<sup>82</sup> dan *S. salivarius* merupakan bakteri yang pertama kali berada pada *biofilm* selama awal pembentukan plak, tetapi *S. sanguinis* lebih banyak daripada *S. salivarius*.<sup>75</sup>

*Streptococcus* rongga mulut merupakan spesies bakteri Gram positif, anaerobik fakultatif, tidak bergerak, pada umumnya memiliki permukaan berfibрил, kadang-kadang berkapsul. Termasuk di dalam golongan *Streptococcus* rongga mulut adalah kelompok *mutans*, *salivarius*, dan *mitis*. *S. sanguinis* termasuk dalam kelompok *mitis*

dengan karakteristik berbentuk kecil dan *elastis*.<sup>61</sup> *Streptococcus* juga digolongkan dalam kelompok kuning bersama *Actinomyces viscosus* sebagai kelompok bakteri yang pertama berkolonisasi dalam rongga mulut.<sup>76</sup>

*S. sanguinis* merupakan anggota mikroflora normal, yang merupakan pemegang peran utama dalam kolonisasi bakteri. Karakteristik *S. sanguinis* adalah berbentuk batang berantai. Berdasarkan struktur dinding sel, bakteri ini digolongkan pada bakteri gram positif karena memiliki lapisan *multilayer* peptidoglikan yang tebal daripada gram negatif. Hal ini dapat diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Bakteri gram positif akan memberikan warna hijau biru pada pewarnaan Gram. Berdasarkan kebutuhan terhadap oksigen, *S. sanguinis* digolongkan pada bakteri anaerob fakultatif karena dapat memanfaatkan oksigen untuk menghasilkan energi dengan respirasi, namun saat oksigen tidak memadai, bakteri ini dapat melakukan fermentasi untuk sintesis *Adenosine Triphosphate* (ATP) Berdasarkan ilmu taksonomi, bakteri *S. sanguinis* diklasifikasikan sebagai berikut.<sup>83</sup>

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Lactobacillus</i>
Familia	: <i>Streptococcaceae</i>
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Spesies	: <i>Streptococcus sanguinis</i>

*S. sanguinis* termasuk anggota *S. viridans*, nama ini berasal dari bahasa latin ‘hijau’. Karakteristik *S. viridans* yaitu kemampuan menghasilkan *hemolysis alpha* pada agar darah, merupakan kemampuan *S. viridans* untuk mengoksidasi hemoglobin dalam eritrosit dengan mensekresi  $H_2O_2$ , yang menyebabkan perubahan warna menjadi lebih hijau di sekeliling koloni pertumbuhan pada agar darah.<sup>84</sup>

*S. sanguinis* secara langsung berikatan dengan mikroorganisme lain yang melekat pada gigi dalam bentuk plak gigi dan berkontribusi dalam etiologi karies dan penyakit periodontal. *S. sanguinis* dikenal sebagai penyebab *bacterial endocarditis*, penyakit dengan tingkat morbiditas tinggi yang dapat berakibat fatal bila tidak dirawat. *S. sanguinis* dan *S. viridans* lain dalam mulut diketahui sebagai patogen penting dalam aliran darah, terlihat pada pasien neutropeni.<sup>84</sup>

Klasifikasi *S. viridans* terdiri dari 9 spesies yaitu *S. mutans*, *mitis*, *oralis*, *sanguinis*, *gordonii*, *crista*, *salivarius*, *vestibularis* dan *parasanguis*. *S. sanguinis* merupakan *streptococcus* yang sangat dikenal dan secara umum diidentikan dalam infeksi yang disebabkan kelompok. Beberapa gambaran *S. sanguinis* meliputi produksi *glucans* dari sukrosa, mengikat *platelet* mengikat matrik ekstraselular seperti *laminin* dan *fibronectin*, mengikat protein saliva, kemampuan untuk koagregasi dengan mikroflora lain dan mempunyai kemampuan genetik.<sup>66</sup>

Pembentukan plak supragingiva dipelopori oleh perlekatan lemah dari *streptococcus* ke glikoprotein saliva yang membentuk pelikel pada permukaan gigi. Keadaan ini diikuti dengan perlekatan kuat oleh polisakarida ekstraseluler (*glucans*) yang disintesis oleh bakteri. Koloni bakteri yang pertama adalah *S. mitis*, *S. sanguinis*, *A. viscosus* dan *A. naeslundii*.<sup>23</sup> Bila bakteri ini dibiarkan berkembang biak selama beberapa hari, akan timbul peradangan gingiva.<sup>85</sup>

*S. sanguinis* merupakan komponen kolonisasi bakteri yang penting dalam mulut. Salah satu sifat *S. sanguinis* adalah kemampuan dalam melakukan agregasi segera setelah gigi dibersihkan. *S. sanguinis* juga menghasilkan *neuraminidase*, dimana *neuraminidase* pada saliva akan membantu pembentukan plak gigi. *S. sanguinis* dapat berperan sebagai *scaffold* (penggantungan) tempat melekatnya mikroorganisme lain di dalam rongga mulut yang dapat mengawali timbulnya penyakit periodontal dan menyebabkan bakterial endokarditis yang dapat menyebabkan kematian bila tidak dirawat.<sup>20,29</sup>

*S. sanguinis* pertamakali berkoloni pada rongga mulut sejak bayi usia 9 bulan.<sup>86</sup> dan dapat memberikan perlindungan atau berperan antagonis melawan bakteri kariogenik seperti *S. mutan*.<sup>78</sup> *S. sanguinis* juga ditemukan pada aliran darah yang mendiami katup jantung yang menyebabkan *sub bacterial endocarditis* dengan dihasilkannya *glucans* ekstraseluler, *septicemia* dan *thrombosis* yang dapat menyebabkan kematian.<sup>20,65,86,87</sup>

*Streptococci* berlomba untuk melekat pada permukaan gigi yang dilapisi saliva dan dapat menghasilkan senyawa antimikrobal seperti *bacteriocins* dan hidrogen peroksida.<sup>66,68</sup> Ketika *oral* biofilm dalam jumlah banyak, kolonisasi awal atau pioner yaitu *S. gordonii* dan *S. sanguinis* dapat bersifat antagonis terhadap *S. mutans*, baik pada studi klinis.<sup>68</sup> dan eksperimental pada tikus.<sup>71</sup>

*S. mutans* dapat menjadi dominan dalam *oral biofilm* menyebabkan perkembangan karies. Dominan *S. mutans* tergantung pada hasil kompetisi dengan *S. sanguinis* dan dipengaruhi oleh produksi komponen antimikrobal.<sup>87</sup> Sebagai contoh *S. mutans* menunjukkan ekspresi kepadatan *bacteriocins mutacin* I dan IV ketika diaplikasikan dalam *plat assay in vitro* sebelum *S. sanguinis* diaplikasikan. Sebaliknya *S. sanguinis* menghasilkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ketika diaplikasikan sebelum *S. mutans*.<sup>66,68</sup>

Penelitian terbaru melaporkan bahwa *S. sanguinis* dan *S. gordonii* tumbuh dibawah kondisi *aerob* dapat lebih baik menghambat *S. mutans* daripada ketika dibawah kondisi *anaerob*.<sup>66</sup> Kreth dkk (2008) menunjukkan bahwa interaksi spesies dipengaruhi oleh adanya oksigen dan perbedaan produksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oleh *S. sanguinis* dan *S. gordonii*. Adanya oksigen, *S. sanguinis* dan *S. gordonii* menghasilkan DNA lebih banyak pada medium pertumbuhan. Stimulasi kemampuan sistem *S. mutans* memulai produksi *bakteriocin* level tinggi, oleh karena itu keberadaan oksigen tampak sebagai faktor krusial dalam kompetisi antara *S. mutans* dan *S. sanguinis* dan *S. gordonii* dalam *oral biofilm*.<sup>68</sup>

## 2.2 Pencegahan dan Perawatan Gingivitis

Cara terbaik mencegah terjadinya gingivitis adalah dengan melakukan kontrol plak yang benar secara mekanis dan kimiawi. Kontrol plak adalah suatu tindakan membersihkan atau membuang mikroorganisme plak serta mencegah terjadinya akumulasi plak. Penghentian kontrol plak setelah perawatan gingivitis dapat menyebabkan terjadinya kembali gingivitis. Kontrol plak juga merupakan bagian terpenting dari segala tindakan pencegahan penyakit periodontal dan merupakan kunci keberhasilan dari perawatan kedokteran gigi secara keseluruhan.<sup>31</sup>

Kontrol plak secara mekanis dapat dilakukan dengan sikat gigi dan alat bantu seperti benang gigi dan tusuk gigi, akan tetapi banyak individu mengalami kesulitan dalam pembersihan plak secara mekanis, serta kurangnya motivasi. Telah dibuktikan bahwa pembersihan secara mekanis dapat menghentikan gingivitis pada beberapa area, tetapi tidak dapat mencapai daerah interproksimal. Pembersihan plak gigi memberikan hasil yang lebih baik jika penyikatan gigi digabungkan dengan berkumur, dibandingkan jika hanya dengan menyikat gigi saja. Gabungan penyikatan gigi dan berkumur dapat membersihkan gigi hingga daerah interproksimal.<sup>31</sup>

Dalam percobaan pada manusia ditemukan bahwa jika pembersihan mulut dihentikan, akan terjadi pengumpulan plak dan gingivitis terbentuk dalam waktu 10-21 hari. Beratnya peradangan gingiva berkaitan dengan kecepatan pembentukan plak. Jika pembersihan gigi dimulai kembali, dalam waktu 2 hari sebagian besar plak hilang dari permukaan gigi, dan gingivitis sembuh dalam waktu 1-8 hari.<sup>30</sup>

Kesuksesan perawatan periodontal tergantung pada kepatuhan pasien dalam menjaga kebersihan mulut dan terapi penunjang, atau pemeliharaan dan terapi periodontal.<sup>3,17</sup> Tanpa intervensi dokter gigi secara teratur, pasien tidak dapat mencapai level pemeliharaan kesehatan mulut yang baik untuk mencegah akumulasi plak atau bertambah parahnya penyakit.<sup>3</sup> Pasien dapat melakukan kontrol plak yang baik dengan menyikat gigi 2 kali sehari dan diajarkan cara menyikat gigi dengan benar, termasuk mengatur diet makan dan pemberian fluor serta berkumur klorheksidin.<sup>3</sup>

Kontrol plak secara kimiawi dilakukan dengan menggunakan obat kumur dan antibiotika. Pada dekade terakhir banyak digunakan obat kumur sebagai cara kimiawi untuk mencegah dan mengobati gingivitis serta untuk mengurangi akumulasi plak. Beberapa peneliti menyatakan bahwa obat kumur dapat menghambat pertumbuhan plak dan mengurangi gingivitis.<sup>30</sup>

Pada umumnya obat kumur yang mengandung antiseptik banyak digunakan untuk mengurangi dan mencegah peradangan gingiva. Klorheksidin adalah obat kumur dari bahan kimia yang masih dianggap sebagai *gold standard* dalam perawatan penyakit periodontal. Hal ini diperkuat dengan penelitian Marsh dan Martin (2009) klorheksidin dapat efektif terhadap *biofilm S. sanguinis* pada 10-50 kali kadar hambat minimal,<sup>23</sup> namun produk ini memiliki beberapa efek samping yang tidak menguntungkan seperti pewarnaan ekstrinsik pada gigi dan lidah, rasa tidak enak, gangguan pengecap, rasa sakit dan iritasi pada mukosa mulut karena mengandung alkohol.<sup>32</sup>

Pertumbuhan bakteri pada *biofilm* menunjukkan tanda khusus seperti penurunan sensitivitas terhadap antibiotik atau agen antimikrobal, termasuk pasta gigi atau obat kumur. Sebagai contoh, konsentrasi hambat *S. sobrinus* dalam *biofilm* terhadap klorheksidin 300 x KBM dan terhadap *amine fluoride* adalah 75 x KBM. Demikian juga amoksilin dan doksisisiklin tidak mempunyai efek pada *viabilitas* dari *S. sanguinis* pada *biofilm* pada level kadar hambat minimal, dan secara laboratoris

*P.gingivalis* pada *biofilm* meningkatkan toleransi terhadap doksisisiklin dan metronidasol. Eliminasi total dari *biofilm* kadang-kadang membutuhkan paparan sampai 500 kali kadar hambat minimal untuk antibiotik tertentu, meskipun *biofilm S. sanguinis* dapat dibunuh dengan paparan 10-50 kali kadar hambat minimal dari klorheksidin.<sup>23</sup> Hal ini dapat terlihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Peningkatan Toleransi terhadap Agen Antimikrobia Ketika Bakteri Rongga Mulut Tumbuh Sebagai *Biofilm*

Bacterium	Agen antimikrobia	Efek terhadap <i>biofilm</i>
<i>S. sanguinis</i>	klorheksidin	10-50x KHM*
<i>S. sobrinus</i>	Amine fluoride	75 x KBM**
<i>P. gingivalis</i>	Klorheksidin	300 x KBM
	metronidasol	2-8 x KBM
	Doksisisiklin	4-64 x KBM
	Amoksisilin	2-4 x KBM

\* efek *biofilm* = perubahan dalam sensitivitas pertumbuhan sel dalam biofilm dibandingkan terhadap pertumbuhan sel dalam cairan atau kultur *plaktonic*

\* MIC = *Minimum inhibitory concentration* sel *planktonic* ( konsentrasi hambat minimal = KHM)

\*\* MBC = *Minimum bactericidal concentration* sel *planktonic* (konsentrasi bakterisid minimal = KBM) (Marsh dan Martin, 2009)<sup>23</sup>

Antibakteri merupakan suatu zat yang dapat menghambat pertumbuhan bahkan membunuh bakteri. Suatu zat antimikroba yang ideal memiliki toksisitas selektif yang berarti bahwa suatu obat berbahaya bagi parasit, namun tidak membahayakan inang. Toksisitas selektif lebih bersifat relatif sehingga pada konsentrasi tertentu zat dapat ditoleransi oleh inang.<sup>88,89</sup>

Berdasarkan sifat toksisitas selektif, maka antibakteri dapat bersifat menghambat pertumbuhan (bakteriostatik), dan ada yang bersifat membunuh (bakterisidal). Konsentrasi minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan disebut Konsentrasi Hambat Minimal (KHM), sedangkan konsentrasi untuk membunuh bakteri disebut Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari bakteriostatik menjadi bakterisidal bila konsentrasi antibakterinya ditingkatkan melebihi kadar hambat minimal.<sup>88</sup>

Sifat antibakteri dapat berbeda satu dengan lainnya, sehingga dibagi menjadi dua kelompok yaitu berspektrum sempit dan berspektrum luas.<sup>88</sup> Pengukuran aktivitas

antibakteri secara *in vitro*, digunakan untuk menentukan potensi antibakteri dalam larutan, konsentrasinya dalam cairan atau jaringan tubuh, dan sensitivitas bakteri terhadap konsentrasi tertentu suatu zat aktif. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri diantaranya pH lingkungan, komponen perbenihan, stabilitas zat aktif, ukuran inokulum, masa pengeraman, dan aktivitas metabolik bakteri. Bakteri yang aktif dan tumbuh cepat lebih peka terhadap daya kerja zat aktif dibandingkan bakteri yang berada dalam keadaan istirahat.<sup>89</sup>

Ada empat tahap mekanisme kerja antibakteri yaitu penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan fungsi membran sel, penghambatan sintesis protein dan penghambatan sintesis asam nukleat.<sup>88</sup> Secara umum, antibakteri yang bersifat bakteriostatik menghambat metabolisme atau sintesis komponen seluler tanpa menghancurkan sel, sedangkan antibakteri yang bersifat bakterisidal dapat menyebabkan kematian sel dengan mengganggu sintesis atau fungsi dinding sel, membran sel atau keduanya.<sup>90</sup>

Mekanisme pertama berupa penghambatan sintesis dinding, dimana bakteri memiliki dinding sel yang kaku, terdiri dari peptidoglikan dan berfungsi untuk mempertahankan bentuk mikroorganisme dan menahan sel bakteri yang memiliki tekanan osmotik yang tinggi di dalam selnya. Mekanisme antibakteri yaitu merusak dinding sel atau menghambat pembentukannya sehingga menyebabkan lisis pada sel.<sup>90</sup>

Mekanisme kedua yaitu penghambatan fungsi membran sel. Sitoplasma dibatasi oleh membran sitoplasma yang berfungsi sebagai penghalang terhadap permeabilitas aktif, melakukan fungsi transportasi aktif dan dengan demikian mengendalikan susunan dalam sel. Mekanisme kerja antibakteri akan mengganggu integritas fungsional dari membran sel yang dapat menyebabkan keluarnya makromolekul dan ion dari dalam sel bakteri, sehingga terjadi kerusakan atau kematian sel.<sup>90</sup>

Mekanisme ketiga yaitu penghambatan sintesis protein dilakukan dengan menghambat perlekatan mRNA dan tRNA ke ribosom, sehingga pada akhirnya dapat mengganggu proses translasi dan transkripsi bahan genetik. Mekanisme keempat adalah penghambatan sintesis asam nukleat yaitu dengan memutuskan ikatan polimerase RNA dan menghambat metabolisme folat.<sup>88</sup>

Antibakteri dalam suatu produk di bidang kedokteran gigi yang digunakan untuk mengendalikan akumulasi plak dan mencegah penyakit, bekerja dengan empat mekanisme utama, yaitu mengurangi tingkat akumulasi plak baru, mengurangi atau menghilangkan plak yang sudah ada, menekan pertumbuhan bakteri yang berkaitan dengan penyakit selektif, dan mencegah produksi dari faktor virulensi. Kemampuan zat antibakteri tersebut untuk mencegah penyakit bergantung pada konsentrasi yang ada dan waktu kontak. Pada konsentrasi tinggi, agen dapat bersifat bakterisidal, sedangkan pada konsentrasi rendah, agen dapat bersifat bakteriostatik, misalnya dengan cara menghambat produksi enzim seperti *protease* dan *cytokines* yang dihasilkan oleh aktivitas *protease*.<sup>91</sup>

### 2.3 Obat Tradisional

Obat tradisional ialah bahan atau ramuan herbal yang berasal dari tumbuhan, hewan, mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan-bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman.<sup>43,92</sup> Obat modern umumnya mengandung satu atau lebih zat aktif yang jelas identitas dan jumlahnya, sedangkan pada obat tradisional atau obat herbal mengandung banyak kandungan kimia, dan umumnya tidak diketahui atau tidak dapat dipastikan zat aktif yang berperan dalam menimbulkan efek terapi maupun efek samping. Kandungan kimia obat herbal ditentukan oleh banyak faktor seperti letak geografis tanaman, tempat tumbuh tanaman, iklim, cara pembudidayaan, cara dan waktu panen, cara perlakuan paska panen seperti pengeringan dan penyimpanan.<sup>41,44</sup>

Pada dasarnya pemakaian obat tradisional mempunyai beberapa tujuan, yang secara garis besar dapat dibedakan menjadi empat kelompok : 1) memelihara kesehatan dan kebugaran jasmani (promotif), 2) mencegah penyakit (preventif), 3) upaya pengobatan penyakit, baik pengobatan sendiri maupun orang lain dalam upaya mengganti atau mendampingi penggunaan obat sintetik (kuratif), 4) memulihkan kesehatan (rehabilitatif).<sup>92</sup>

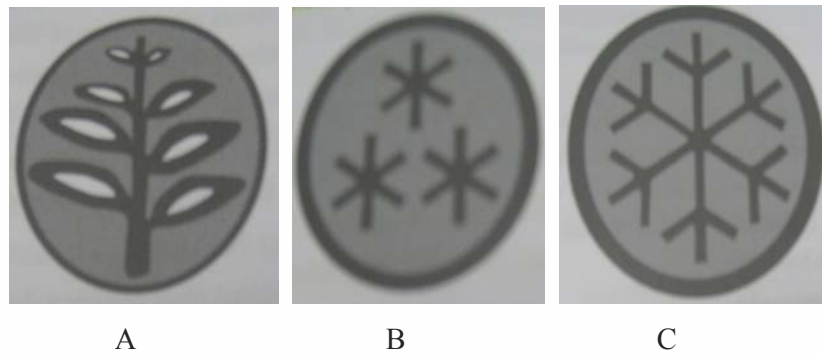
Menurut Chaerunissa dkk (2011), saat ini obat tradisional dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu jamu (*empirical based herbal medicine*), obat



herbal terstandar (*scientific based herbal medicine*), dan fitofarmaka (*clinical based herbal medicine*). Jamu adalah obat tradisional yang disediakan secara tradisional, baik dalam bentuk serbuk seduhan, pil dan cairan yang berisi seluruh bahan tanaman yang menjadi penyusun jamu tersebut serta digunakan secara tradisional.<sup>34</sup> Bentuk jamu tidak memerlukan pembuktian ilmiah sampai klinis (gambar 2.1.), tetapi cukup dengan bukti empiris. Jamu telah digunakan secara turun temurun selama berpuluh-puluh tahun bahkan mungkin ratusan tahun, telah membuktikan keamanan dan manfaat secara langsung untuk tujuan kesehatan tertentu.

Obat herbal terstandar (*scientific based herbal medicine*) adalah obat tradisional yang disajikan dari ekstrak atau penyarian bahan alam yang dapat berupa tanaman obat, binatang maupun mineral. Dalam melaksanakan proses ini dibutuhkan peralatan yang lebih kompleks dan mahal. Ditambah tenaga kerja yang mendukung dengan pengetahuan dan ketrampilan pembuatan ekstrak. Jenis ini pada umumnya ditunjang dengan pembuktian ilmiah berupa penelitian pre-klinik seperti standar kandungan bahan berkhasiat, standar pembuatan ekstrak tanaman obat, standar pembuatan obat tradisional yang higienis dan uji toksisitas akut dan kronis.<sup>34</sup>

Fitofarmaka (*Clinical based herbal medicine*) merupakan bentuk obat tradisional yang dapat disejajarkan dengan obat modern karena proses pembuatannya yang telah terstandar, ditunjang dengan bukti ilmiah sampai uji klinik pada manusia. Hasil uji ini akan lebih meyakinkan para profesi medis untuk menggunakan obat herbal pada sarana pelayanan kesehatan. Masyarakat juga bisa didorong untuk menggunakan obat herbal berbentuk fitofarmaka karena manfaatnya jelas dan disertai bukti-bukti secara ilmiah.<sup>34</sup>



Gambar 2.3. Lambang obat tradisional. A. jamu; B. obat herbal terstandar ; C : fitofarmaka (Chaerunissa dkk, 2009).<sup>34</sup>

Departemen Kesehatan (1985) mengatakan bahwa agar pengembangan obat tradisional dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah dari segi keamanan dan pemakaian pada manusia, maka pengembangannya harus mencakup berbagai tahap pengujian, penelitian dan pengembangan sediaan<sup>93</sup> Adapun tahap-tahap ini meliputi tahap pemilihan (seleksi), tahap penyaringan biologik (*biological screening*), tahap uji farmakodinamik, tahap pengujian toksisitas lanjut, tahap pengembangan sediaan (formulasi), dan tahap pengujian klinik pada manusia.

Tahap pemilihan (seleksi) merupakan tahap awal, yang selanjutnya dikembangkan menjadi fitofarmaka. Pemilihan jenis obat tradisional didasarkan pada prioritas yang telah digariskan oleh Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia (sekarang Badan POM). Adapun pemilihan prioritas meliputi hal-hal : a). Jenis obat tradisional yang diharapkan mempunyai khasiat untuk penyakit-penyakit yang menduduki urutan atas dalam angka kejadian (pola penyakit), b). Jenis obat tradisional yang diperkirakan mempunyai khasiat untuk penyakit-penyakit tertentu berdasarkan inventarisasi pengalaman pemakaian, c). Jenis obat tradisional yang diperkirakan menjadi alternatif yang jarang (atau satu-satunya alternatif) untuk penyakit-penyakit tertentu, misalnya untuk obat kalkuli (batu).

Tahap penyaringan biologik (*biological screening*). Kegunaan uji penyaringan biologik adalah untuk menghindari pemborosan dalam tahap uji lebih lanjut. Hasil positif hanya dapat digunakan untuk perkiraan kemungkinan efek pada manusia. Tujuan tahap penyaringan biologik adalah : **a).** menyaring calon obat

berdasarkan efek farmakologinya. Hal ini dimaksudkan untuk melihat adanya cara kerja obat secara farmakologi pada sistem biologik yang dapat merupakan petunjuk terhadap adanya khasiat terapeutik. Pengujian dapat dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo* pada hewan yang sesuai. Tidak semua khasiat terapeutik calon obat dapat diperkirakan secara langsung pada hewan percobaan. Beberapa khasiat yang mungkin dapat diperkirakan dari uji penyaringan dengan hewan coba misalnya daya analgesia, tidur, hipertensi, diabetes dan *arthritis*.<sup>39</sup>; **b**). menyaring toksisitas akut calon obat. Uji toksisitas akut merupakan persyaratan formal keamanan obat untuk pemakaian pada manusia. Tahap paling ideal apabila dikerjakan pada 3 spesies hewan mamalia (2 *rodent* dan 1 *non rodent*). Beberapa hal yang diperiksa adalah : spektrum toksisitas akut : sistem biologik apa yang paling peka terhadap calon obat, dan *median lethal dose* (LD<sub>50</sub>). Teknik pelaksanaan pengujian harus memenuhi persyaratan yang umum yaitu menggunakan 1 ekor *rodent* sebagai hewan percobaan. Bahan yang diuji adalah bahan yang nantinya akan diberikan pada manusia. Bentuk dapat berbeda tetapi ekuivalensinya harus sama. Parameter toksikologi yang perlu mendapat perhatian khusus adalah kemungkinan adanya toksik pada sistem organ vital seperti kardiovaskuler, susunan saraf, gastrointestinal, pernafasan dan lain-lain. Jika calon obat mempunyai pengaruh toksik pada sistem ini, umumnya akan terdeteksi pada tahap uji toksisitas akut.

Tahap uji Farmakodinamik dimaksudkan untuk lebih mengetahui secara lugas pengaruh farmakologik pada berbagai sistem biologik, bila diperlukan. Penelitian dilakukan pada hewan coba yang sesuai baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Apabila calon obat sudah menjalani tahap 2 uji penyaringan biologik dan dipandang belum dapat untuk dikerjakan penelitian farmakodinamik, maka hal ini bukanlah menjadi hambatan untuk uji lebih lanjut. Tahap farmakodinamik lebih banyak tergantung pada sarana dan prasarana yang ada, baik perangkat lunak maupun keras.

Tahap Pengujian Toksisitas Lanjut meliputi : Toksisitas sub akut atau subkronik, toksisitas kronik dan toksisitas khusus. Uji toksisitas subakut atau sub kronik dikerjakan pada mamalia dengan menggunakan 3 spesies hewan coba (2 *rodent* dan 1 *non rodent*). Obat diberikan selama 3 bulan.<sup>59</sup> Pada tahap ini dilakukan pemeriksaan histopatologis organ vital seperti hepar, ginjal, paru-paru, otak, sistem

hematologik. Teknik pelaksanaan pengujian harus dikerjakan dengan cara-cara standar (baku) yang memenuhi persyaratan ilmiah.

Uji Toksisitas Kronik mempunyai prosedur sama seperti uji toksisitas subakut, tetapi obat diberi selama 6 bulan atau lebih, dapat mencapai 2 tahun.<sup>94</sup> Uji Toksisitas Khusus seperti uji teratogenesis, uji karsinogenesis, uji mutagenitas, uji terhadap fungsi-fungsi reproduksi dan lain-lain. Diperlukan atau tidaknya uji, tergantung pada kemungkinan terjadinya efek-efek tersebut jika dipakai pada manusia. Adapun uji mutagenitas, karsinogenesis dan teratogenesis harus dilakukan bila obat tersebut nantinya akan digunakan secara kronik.<sup>94</sup>

Tahap pengembangan sediaan (Formulasi) dimaksudkan agar bentuk obat yang akan diberikan pada manusia nantinya memenuhi persyaratan kualitas maupun estetika. Persyaratan kualitas dan cara pemberian harus diperhatikan secara khusus. Tahap pengembangan sediaan ini meliputi standarisasi sederhana, penentuan identitas serta pembuatan sediaan terstandar.

Tahap pengujian klinik pada manusia dapat dilakukan apabila obat herbal tersebut telah terbukti aman dan berkhasiat pada hewan coba dalam uji praklinik. Persyaratan minimal keamanan obat harus dipenuhi untuk memulai uji klinik pada manusia. Perlu dipertimbangkan apakah uji toksisitas akut (tahap 2) cukup memenuhi persyaratan untuk memulai uji klinik atau perlu ditambah dengan uji toksisitas sub akut, kronik atau uji toksisitas yang spesifik. Kualitas sediaan harus memenuhi syarat pemakaian pada manusia.

Uji klinik terbagi menjadi 4 fase yaitu : fase I (sukarelawan sehat), fase II awal (pasien terbatas tanpa kelompok kontrol), fase II akhir (pasien terbatas dengan kelompok kontrol serta persyaratan yang ketat), fase III (uji klinik *formal* dan *definitif*), dan uji IV (paska pemasaran).

**Fase I** : sukarelawan sehat. Pengujian dilakukan kepada sukarelawan sehat dalam jumlah terbatas untuk melihat efek farmakologi (farmakodinamik dan farmakokinetik) dan kemungkinan efek yang tidak diinginkan (efek samping seperti toksik). Perubahan-perubahan fungsi fisiologik yang vital dan keluhan-keluhan harus diperhatikan. Hubungan dosis dengan efek farmakodinamik dan efek yang tidak diinginkan dinilai. Dosis yang diberikan pertamakali dianjurkan dari yang paling rendah kemudian secara bertahap dinaikkan.<sup>40</sup> Sukarelawan harus mendapat keterangan secara jelas dan memberikan persetujuan tertulis (*informed consent*).

Adapun pemeriksaan yang dilakukan yaitu : pemeriksaan anamnesis, pemeriksaan klinik, dan pemeriksaan laboratorium, misalnya fungsi hati, ginjal dan sistem hematologik, serta pemeriksaan khusus jika perlu seperti elektrokardiografi dan lain lain.

**Fase II awal** : pasien terbatas tanpa kelompok kontrol. Pengujian dilakukan pada pasien dalam jumlah terbatas, untuk melihat apakah obat mempunyai khasiat terapeutik. Pengujian dilakukan secara terbuka tanpa kelompok kontrol. Selain berkhasiat terapeutik juga dinilai kemungkinan adanya efek yang tidak diinginkan calon obat. Uji klinik fase II awal belum merupakan uji klinik yang pasti, kesimpulan yang didapat masih bersifat sementara.

**Fase II akhir** : Pasien terbatas dengan kelompok kontrol serta persyaratan yang ketat (*explanatory trials*). Fase II akhir merupakan uji klinik yang *definitif* dengan jumlah penderita terbatas dan dilakukan dengan persyaratan metodologi dan monitoring yang ketat (*explanatory trials*). Kontrol atau pembanding dapat berupa *placebo* atau obat standar (baku) yang sudah diketahui secara pasti.

**Fase III** : uji klinik formal dan *definitif*. Fase III meliputi *explanatory* dan *pragmatic trials* dengan jumlah pasien yang lebih banyak.

**Fase IV** : paska pemasaran merupakan surveilan efek samping yang langka (*rare side effects*) yang baru muncul setelah pemakaian jangka panjang yang tidak mungkin dikenali pada fase uji klinik sebelum pemasaran. Uji ini dilakukan untuk melihat manfaat obat pada keadaan yang sesungguhnya dalam klinik, pada populasi penderita khusus, misalnya orang lanjut usia.

Bilamana hasil uji preklinik obat tradisional memperlihatkan khasiat seperti yang diharapkan, maka dilanjutkan ke tahap teknologi farmasi mulai dari identifikasi sampai membuat sediaan obat yang lebih mudah pemakaiannya. Adapun bentuk sediaan obat tradisional yang digunakan pada upaya pelayanan kesehatan dapat berupa rajangan, serbuk, kapsul, pil, tablet, pastiles, dodol atau jenang, cairan obat dalam, eliksir, cairan obat luar, salep atau krim, koyok, parem, pilis dan tapel.<sup>45</sup> Sebelum membuat suatu sediaan obat dari bahan alam, perlu diketahui senyawa bioaktif yang berperan yang berguna dalam standarisasi sediaan. Untuk mengetahui senyawa aktif tersebut dapat dilakukan salah satunya dengan cara melakukan prosedur ekstraksi, kemudian ekstrak tersebut diuji secara farmakologis.<sup>45</sup>

Bentuk formulasi ini selanjutnya perlu diuji dosis pemakaiannya. Dalam pengujian dosis bahan uji obat tradisional, digunakan tiga tingkat dosis dengan mempertimbangkan aktivitas farmakologik dan hasil uji toksisitas akut. Pemilihan dosis tertinggi perlu diupayakan yang dapat menimbulkan efek toksik yaitu perubahan-perubahan hematologik, biokimia, anatomik dan histologis, namun mayoritas harus dapat bertahan hidup. Dosis yang paling rendah haruslah mendekati dosis efektif sesuai dengan spesies yang digunakan.<sup>45</sup>

#### 2.4 *Hibiscus sabdariffa* Linn

*Hibiscus sabdariffa* Linn dalam bahasa Indonesia disebut Rosela. Rosela di daerah Sunda dikenal dengan nama *gamel walanda*, di Ternate dengan nama *kasturi rortha*, di Jawa Tengah dengan nama *mrambos hijau*, di Padang dengan nama *asam jarot*, di Sumatra selatan dengan nama *kesew jawe*, dan di Muara Enim dengan nama *asam rejang*.<sup>95,96</sup>

*Hibiscus sabdariffa* L. merupakan anggota suku *malvaceae*. Menurut Backer dan Bakhuizen (1965) dan Cronquist (1981) klasifikasi tanaman *H. sabdariffa* L.<sup>97,98</sup> adalah :

Regnum	: <i>Plantae</i>
Superdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Subkelas	: <i>Dilleniidae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Familia	: <i>Malvaceae</i>
Genus	: <i>Hibiscus</i> L.
Spesies	: <i>Hibiscus sabdariffa</i> L

Di Malaysia, *H. sabdariffa* L dikenal sebagai asam susur, asam paya, atau asam kumbang. Di Cina dikenal *lou shen kui*, *lou shen hua*. Di Thailand dikenal sebagai *kachieb priew*. Di Belanda dikenal *Zuring*, dan di Sinegal dikenal sebagai *bisap*. Di Inggris dikenal dengan *roselle*, *rozelle*, *sorrel*, *red sorrel*, *white sorrel*,

*jamaica sorrel, indian sorrel, guinea sorrel, sour-sour, queensland jelly plant, jelly okra, lemon bush dan florida cranberry*. Di Afrika utara dikenal *karkade* atau *carcade*. Nama *carcade* inilah yang dipakai sebagai nama dagang rosela, baik dalam dunia pengobatan maupun sebagai bahan makanan di benua Eropa.<sup>95</sup>

*H. sabdariffa* L. merupakan herba tahunan yang bergetah. Tinggi dapat mencapai ketinggian 0.5–3 meter, serta mengeluarkan bunga hampir sepanjang tahun. Batangnya bulat, tegak, berkayu dan berwarna merah. Daun tunggal, berbentuk bulat telur, pertulangan menjari, ujung tumpul, tepi bergerigi dan pangkal berlekuk. Panjang daun 6-15 cm dan lebar 5-8 cm.<sup>99</sup> Tangkai daun bulat berwarna hijau dengan panjang 4-7 cm, seperti terlihat pada gambar 2.4.

Bunga *H. sabdariffa* L. yang keluar dari ketiak daun merupakan bunga tunggal, artinya pada setiap tangkai hanya terdapat satu bunga. Bunga ini mempunyai 8-11 helai kelopak yang berbulu, panjang 1 cm, pangkalnya saling berlekatan, dan berwarna merah.<sup>95</sup> Kelopak bunga ini sering dianggap sebagai bunga oleh masyarakat. Bagian inilah yang sering dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan minuman.<sup>99</sup> Mahkota bunga berbentuk corong terdiri dari 5 helai, panjangnya 3-5 cm. Tangkai sari yang merupakan tempat melekatnya kumpulan benang sari berukuran pendek dan tebal, panjang sekitar 5 mm dan lebar sekitar 5 mm. Putik berbentuk tabung berwarna kuning atau merah.<sup>96</sup>



Gambar 2.4. Foto Tanaman *Hibiscus sabdariffa* L.(koleksi pribadi)

Buah berbentuk kotak kerucut, berambut, terbagi menjadi 5 ruang, berwarna merah. Bentuk biji menyerupai ginjal, berbulu dengan panjang 5 mm dan lebar 4 mm. Saat masih muda, biji berwarna putih dan setelah tua berubah menjadi abu-abu.<sup>96,100</sup> *H. sabdariffa* L merupakan anggota famili *Malvaceae*. *H. sabdariffa* L dapat tumbuh baik di daerah yang beriklim tropis dan subtropis. Tanaman ini mempunyai habitat asli yang terbentang dari India hingga Malaysia, namun saat ini tanaman ini telah tersebar luas di daerah tropis dan subtropis di seluruh dunia. Karena itu *H. sabdariffa* L. mempunyai nama umum yang berbeda-beda di berbagai negara.<sup>96</sup>

Bahan aktif dari kelopak bunga *H. sabdariffa* L. adalah *gossyptin*, *anthocyanin*, *glucoside hibiscin* dan *flavonoids*. Menurut DEP.KES.RI. NO. SPP.1065/35.15/05 setiap 100 gram kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung vitamin C (260-280 mg setiap 100 g), vitamin D, vitamin B1, B2, niacin, riboflavin, betakaroten, zat besi, asam amino, polisakarida, omega 3, kalsium (Rasa asam dari kelopak rosela disebabkan kandungan vitamin C, asam sitrat dan asam glikolik).<sup>101</sup>

Hasil studi kimia pada kelopak bunga kering *H. sabdariffa* L. ditemukan *aluminium*, *chromium copper*, besi<sup>55</sup>, *hibiscus acid* dan *6-methyl ester*<sup>43</sup>, *protocatechuic acid* (PCA), polifenol<sup>103,104,105</sup>, *anthocyanidins* seperti *delphinidin*, *cyanidin*, *glycoside*, *cyanidin-3-glucoside* (*delphinidin-pentoside-glucoside*), *delphinidin-3 glucoxyloxide* (*delphinidin-3-sambubioside*) sebagai mayor komponen yang biasa dikenal dengan *hibiscin*, *delphinidin-3-monoglucoside*, *cyanidin-3-monoglucoside*, *cyanidin-3-sambubioside*,<sup>55,106,107</sup> *eugenol*, *sterol  $\beta$ -sitosterol* dan *ergosterol*<sup>108</sup>, *sabdaretin* dan *hibiscetin* merupakan *aglicone hibiscetin*, asam polisakarida heterogen dan komponen fenol termasuk *gossypetine-3-glycoside*, *flavonoids*, polisakarida larut dalam air, *flavone* dan *anthocyanin*, saponin,  *$\beta$ -sitosterol trace alkaloid*,  *$\beta$ -D-glucoside*.<sup>55</sup>

Karakteristik warna merah dihasilkan oleh *anthocyanin*, *hibiscin*<sup>55</sup> yaitu *delphinidine-3-glucoside* dan *cyanidine-3-glucoside*. Adanya  *$\beta$ -carotene*, *riboflavin*, *thiamine*, *niacin*, *ascorbic acid*, *maleic acid* dan *hibiscus acid*. *Delphinidin-3-sambubioside* merupakan *anthocyanin H. sabdariffa* L. dilaporkan dapat menginduksi *apoptosis* pada sel leukemik manusia melawan spesies oksigen reaktif dengan cara menghambat terjadinya kehilangan membran mitokondria dan pelepasan sitokrom dari mitokondria ke sitosol.<sup>109</sup> Polisakarida menstimulasi proliferasi dan diferensiasi dari keratinosit manusia.<sup>109</sup> *Hibiscus protocatechuic acid*



mempunyai efek inhibisi tumor pada kulit tikus dan sel leukemik manusia secara respektif.<sup>104</sup> *H. sabdariffa* L. juga dilaporkan memiliki efek antiseptik, *aphrodisiac*, *astringent*, *cholagogue*, *demulcent*, *digestive*, *diuretic*, *emollient*, *purgative*, *refrigerant*, *sedative*, *stomachic* dan tonik.<sup>109</sup>

Karakteristik fisiokimia kelopak bunga *H. sabdariffa* L. memiliki kadar vitamin C yang tinggi dengan kandungan gula yang rendah, juga mengandung asam suksinat dan asam oksalat yang merupakan dua asam organik yang dominan. *H. sabdariffa* L. memiliki kandungan asam askorbat yang lebih tinggi daripada jeruk dan mangga. Kelopak rosela mengandung vitamin A dan 18 jenis asam amino yang diperlukan tubuh. Salah satunya adalah arginin yang berperan dalam proses pematangan sel tubuh. Di samping itu, *H. sabdariffa* L. juga mengandung protein, kalsium, dan unsur-unsur lain yang berguna bagi tubuh. Asam amino yang terdapat dalam tanaman ini antara lain *arginine*, *cystine*, *histidine*, *isoleucine*, *leucine*, *lysine*, *methionine*, *phenylalanine*, *threonine*, *tryptophan*, *tyrosine*, *valine*, *aspartic acid*, *glutamic acid*, *alanine*, *glycine*, *proline* dan *serine*.<sup>109</sup>

Efek antihyperlipidemia dan antioksidan dapat menurunkan *Low Density Lipoproteins* (LDL) yang dapat mencegah penyakit kardiovaskuler yang disebabkan karena tingginya kolesterol. Asam sitrat meningkatkan aliran darah ke permukaan kulit. *Riboflavin*, *niacin*, *karoten*, *calcium* dan zat besi dapat menurunkan level amonia, urea, asam urat, kreatin dan nitrogen non protein dalam darah.<sup>54</sup>

Kandungan *theaflavins* dan *catechins* membantu menjaga kolesterol dalam darah dengan cara membatasi penyerapan kolesterol dan meningkatkan pembuangan kolesterol LDL dari hati. Vitamin C berfungsi dalam menetralkan lemak dalam tubuh, sehingga bermanfaat untuk *body slimming* dan *body firming*. Selain itu kandungan vitamin C yang tinggi secara farmakologis berfungsi membantu penyerapan semua vitamin dan mineral. Vitamin dan mineral membantu metabolisme tubuh. Vitamin A dan C menjaga, mempertahankan dan meningkatkan kesehatan tubuh serta mencegah penuaan dini dan munculnya katarak. Kandungan *calcium* tinggi sangat membantu pertumbuhan serta kekuatan tulang dan gigi. Vitamin A, C dan *calcium* berguna untuk kesehatan mata, kulit dan tulang sedangkan serat untuk memperbaiki sistem pencernaan.<sup>55</sup>

Flavonoid dalam kelopak bunga *H. sabdariffa* L bermanfaat untuk mencegah kanker, terutama yang disebabkan oleh radikal bebas, seperti kanker lambung dan leukimia. Selain itu flavonoid juga mempunyai efek protektif terhadap penyakit kardiovaskular termasuk hipertensi.<sup>110</sup> Senyawa ini dapat digunakan untuk penderita hipertensi, kelainan hati, osteoporosis, diuretik, mengurangi kekentalan darah, mencegah infeksi karena khasiatnya sebagai antibakteri, antiseptik, dan anti radang, mengobati sariawan karena kandungan vitamin C, dan mengurangi kolesterol darah. Pada penderita Diabetes Melitus selain menurunkan kadar gula darah, dapat menyembuhkan penyakit oleh karena kandungan flavonoid dalam menetralkan radikal bebas yang mengakibatkan kerusakan sel beta pankreas yang memproduksi insulin.<sup>101</sup> Senyawa flavonoid dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme karena mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen. Polifenol atau fenol bekerja sebagai antibakteri dengan cara mendenaturasi protein sel dan merusak membran plasma.<sup>40,55</sup>

Kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai beberapa khasiat, salah satunya sebagai antibakteri. Sharaf berhasil membuktikan bahwa kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dan zat warna merah di tanaman ini dapat membunuh *Mycobacterium tuberculosis*, bakteri penyebab Tuberculosis (TBC).<sup>111</sup> Ekstrak air dan zat warna yang terkandung di dalamnya mempunyai efek letal terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, penyebab TBC.<sup>54</sup> Penelitian Borisupeth melaporkan bahwa ekstrak air *H. Sabdariffa* mempunyai efek antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophilia* merupakan bakteri Gram negatif, menyebabkan terjadinya *hemorrhagic septicemia* dan *Streptococcus agalactiae* yaitu katalase negatif, Gram positif cocci, yang merupakan penyebab *meningoencephalitis streptococci* atau *popeye disease*. *Popeye disease* umumnya menyerang pada ikan, sapi, babi atau manusia. *H.sabdariffa* L. dapat berfungsi sebagai antibakteri herbal berspektrum luas untuk praktek *ethnoveterinary*.<sup>56</sup>

Penelitian tentang kandungan antioksidan *H. sabdariffa* L. menunjukkan bahwa kandungan antioksidan pada *H. sabdariffa* L. lebih tinggi dibandingkan dengan kumis kucing dan bunga knop, yaitu sebesar 1,7 mmol/prolox. Zat aktif yang terkandung di dalamnya yaitu *gossypetin*, *anthocyanin* dan *glucoside hibiscin*. Ketiganya berkhasiat sebagai antioksidan yang kuat.<sup>95</sup> Antioksidan ini meredam aksi radikal bebas yang menyerang molekul tubuh. Jika guanin dalam DNA terserang radikal bebas, mudah terjadi kesalahan replikasi DNA. Kerusakan DNA memicu

oksidasi *low density lipoprotein*, kolesterol dan lipid penyebab penyakit degeneratif seperti jantung koroner, kanker, diabetes melitus, termasuk kerusakan kulit yang menyebabkan penuaan dini seperti kerutan, flek hitam. Kandungan antioksidan dapat meredam radikal bebas yang memicu pertumbuhan sel kanker.<sup>95</sup> Makin gelap atau pekat warna merahnya, makin tinggi kadar antioksidannya dan rasanya makin asam.<sup>96</sup>

## 2.5 Senyawa Aktif

Terdapat dua macam proses metabolisme dalam tanaman yaitu metabolisme primer dan sekunder. Proses metabolisme primer menghasilkan senyawa-senyawa yang digunakan untuk proses biosintesis sehari-hari, seperti karbohidrat, protein, lemak, dan asam nukleat, sedangkan proses metabolisme sekunder menghasilkan senyawa dengan aktivitas biologis tertentu seperti tanin, terpenoid, alkaloid, saponin dan flavonoid dan steroid.<sup>41</sup>

Senyawa hasil metabolisme sekunder dikenal sebagai metabolit sekunder, yang diproduksi sebagai bentuk pertahanan tumbuhan dari pengaruh buruk lingkungan atau serangan hama penyakit. Metabolit sekunder tidak memiliki fungsi khusus dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Fungsi metabolit sekunder adalah melindungi tanaman dari serangan mikroba, mempertahankan diri dari gangguan predator, melawan gangguan herbivora dengan membentuk senyawa toksis yang menyebabkan tanaman tersebut beracun, perlindungan terhadap lingkungan, misalnya antosianin diproduksi untuk melindungi tanaman dari sinar *ultra violet*, sebagai agen atraktan dengan menarik kehadiran serangga dan herbivora lain untuk membantu penyebaran biji.<sup>41</sup>

Berdasarkan jumlah atom karbonnya, terpenoid dapat digolongkan ke dalam kelompok : *hemiterpenoid* (C5), *monoterpenoid* (C10), *seskiterpenoid* (C15), *diterpenoid* (C20), *sesterterpenoid* (C25), *triterpenoid* (C30), *tetraterpenoid* (C40), dan *politerpenoid* (C>40). Triterpenoid (C30) sendiri terdiri dari steroid, saponin dan glikosida jantung. Triterpenoid mempunyai aktivitas fisiologi yang sangat berarti dalam dunia pengobatan tradisional. Komponen aktifnya untuk mengobati diabetes, berefek sitotoksik untuk mengobati tumor, malaria.<sup>41</sup>

Sterol atau steroid adalah senyawa yang banyak ditemukan pada hewan atau tumbuhan, merupakan triterpena yang memiliki cincin *siklopentana*

*perhidrofenantreno* sebagai kerangka dasarnya dan memiliki gugus hidroksil.<sup>111,112</sup> Senyawa sterol yang terdapat pada tumbuhan disebut *phytosterol*. *Phytosterol* merupakan senyawa berbentuk bubuk, memiliki titik leleh antara suhu 135-142 °C, dan larut dalam minyak. Senyawa ini banyak digunakan sebagai bahan pangan, obat-obatan dan kosmetik. *Phytosterol* memiliki menghambat penyerapan kolesterol dalam tubuh, dan menurunkan kadarnya dalam darah.<sup>114,115</sup> *Phytosterol* dapat berfungsi sebagai analgetik, antimalaria, antiseptik.

Saponin adalah suatu glikosida yang ditemukan dari sumber alami dan dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa setelah dikocok dengan pelarut cair.<sup>41</sup> Saponin merupakan glikosida dari triterpenoid atau aglikon steroid dengan jumlah rantai gula yang bervariasi.<sup>116</sup> Fungsi saponin dalam tanaman adalah sebagai bentuk penyimpanan karbohidrat, produk buangan dari metabolisme tumbuhan serta pelindung terhadap serangan serangga. Saponin mempunyai rasa pahit, dalam larutan air membentuk busa yang stabil. Saponin bersifat hipokolesterolemik, imunostimulator dan antikarsinogenik. Mekanisme antikarsinogenik saponin meliputi efek antioksidan dan sitotoksik pada sel kanker. Selain itu saponin sebagai agen antimikroba terhadap bakteri, virus, jamur dan ragi.<sup>116</sup>

Fenol atau asam karbolat atau benzenol adalah zat kristal yang tidak berwarna hingga berwarna merah muda cerah yang memiliki bau tajam dan khas. Senyawa ini mudah larut dalam air, sehingga seringkali berikatan dengan gula sebagai glikosida. Golongan terbesar dari senyawa fenol adalah kelompok flavonoid dan tanin.<sup>41</sup> Senyawa fenol memiliki aktivitas antiseptik dengan berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada konsentrasi rendah, terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, kemudian fenol bekerja dengan merusak membran sitoplasma dan dapat menyebabkan kebocoran isi sel. Pada konsentrasi tinggi, zat tersebut berkoagulasi dengan protein seluler dan membran sitoplasma mengalami lisis. Aktivitas tersebut sangat efektif ketika bakteri dalam pembelahan, saat lapisan *phospholipid* di sekeliling sel sedang dalam kondisi yang sangat tipis sehingga fenol dapat berpenetrasi dengan mudah dan merusak isi sel.<sup>113</sup>

Flavonoid bertanggung jawab melindungi tanaman dari pengaruh sinar *ultra violet* dan berperan sebagai pemberi warna pada tanaman.<sup>40</sup> Flavonoid bekerja sebagai antioksidan untuk mengendalikan radikal bebas, antivirus, antimikroorganisma,

mengurangi pembekuan darah, melancarkan aliran darah, antiradang, antihipertensi, analgesik, antialergi, merangsang pembentukan estrogen.<sup>41</sup>

Tanin merupakan senyawa fenolik yang larut dalam air, yang berasal dari tumbuhan berpembuluh dengan berat molekul 500 hingga 3000 gram/mol. Senyawa ini banyak terdistribusi pada daun, buah, kulit batang dan batang, umumnya berasa sepat.<sup>112</sup> Tanin mempunyai aktivitas biologis sebagai pengkhelat ion logam, agen presipitasi alkaloid, gelatin, polisakarida, serta anti oksidan biologis, dan merupakan senyawa antibakteri.<sup>117</sup>

## **2.6 Teknologi Ekstraksi**

Perkembangan teknologi dan bentuk pemanfaatan tumbuhan obat menggunakan konsep ekstrak, merupakan peluang dan tantangan pada perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi kefarmasian, pertanian serta kedokteran di Indonesia. Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi kefarmasian pada bidang ekstraksi, analisis dan proses teknologi, menjadikan ekstrak sebagai bentuk bahan yang dapat dipertanggung jawabkan mutu dan keajegan kandungan kimianya. Hal ini disebut sebagai paradigma ekstrak terstandar, baik sebagai bahan baku, bahan antara maupun bahan produk.<sup>118</sup>

Adapun fungsi dari ekstraksi adalah menyediakan sejumlah kecil bahan baku obat yang menunjukkan aktivitas obat dan sifat dari bahan baku tumbuh-tumbuhan dalam bentuk fisik yang sesuai, sehingga berguna dalam campuran resep atau pembuatan produk.<sup>118</sup> Konsep ekstrak terstandar adalah suatu bentuk obat multi komponen yang dapat dipertanggungjawabkan dari aspek konsep keamanan, farmakologi dan khasiatnya.<sup>42</sup>

### **2.6.1 Pengertian Ekstraksi**

Metode ekstraksi merupakan metode awal dalam proses isolasi suatu senyawa. Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair. Dalam memilih pelarut yang akan digunakan dalam proses ekstraksi harus dipertimbangkan apakah pelarut tersebut mampu untuk menarik komponen senyawa yang terdapat

dalam tanaman tersebut. Ragam ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi.<sup>42,112,118</sup>

Simplisia (bahan baku tumbuhan obat) yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat dan protein. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, triterpenoid, dan saponin.<sup>41,42</sup> Struktur kimia yang berbeda-beda akan mempengaruhi kelarutan serta stabilitas senyawa tersebut terhadap pemanasan, udara, cahaya, logam berat dan derajat keasaman.<sup>34,44</sup>

Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Di samping memperhatikan sifat fisik dan senyawa aktif dari simplisia harus juga diperhatikan senyawa lain yang terdapat dalam simplisia seperti protein, karbohidrat, lemak dan gula. Senyawa lain akan mempengaruhi tingkat kejenuhan pelarut sehingga akan berpengaruh pula pada proses pelarutan senyawa aktif kejenuhan kadar senyawa aktif merupakan syarat mutlak mutu ekstrak yang diproduksi, sehingga setiap ekstrak harus distandarisasi.<sup>44</sup>

Standarisasi dalam kefarmasian adalah serangkaian parameter, prosedur dan cara pengukuran yang hasilnya merupakan unsur-unsur terkait paradigma mutu kefarmasian. mutu kefarmasian dalam arti memenuhi syarat standar kimia, biologi dan farmasi, serta stabilitas sebagai produk farmasi. Standarisasi memberi jaminan bahwa produk akhir (obat, ekstrak atau produk ekstrak) mempunyai nilai parameter tertentu yang konstan (ajeg) dan ditetapkan dalam formulasi terlebih dulu.<sup>42</sup>

### **2.6.2 Prosedur Ekstraksi**

Ekstrak tumbuhan obat sebagai bahan dan produk dibuat dari bahan baku tumbuhan obat. Bahan baku tumbuhan obat disebut simplisia. Simplisia adalah bahan baku alamiah yang digunakan sebagai obat dan belum mengalami pengolahan apapun kecuali dikeringkan.<sup>119,120</sup> Simplisia ini menjadi dasar awal yang kemudian diekstraksi menjadi bahan baku obat dan produk sediaan. Selanjutnya produk ekstrak ini harus memenuhi persyaratan parameter standar umum produk atau bahan ekstrak. Dalam

melakukan ekstraksi digunakan cairan pelarut yang sesuai dengan senyawa kandungannya. Dengan demikian ekstrak hanya mengandung sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Faktor utama yang perlu dipertimbangkan dalam memilih cairan pelarut atau penyari : selektivitas, kemudahan bekerja dengan cairan tersebut, ekonomis, ramah lingkungan dan keamanan.<sup>112</sup>

Cairan pelarut yang digunakan harus memenuhi syarat kefarmasian (*pharmaceutical grade*). Sampai saat ini pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol serta turunannya seperti etanol, metanol dan *metylen chloride*, heksana (hidrokarbon aliphatik), toluen (hidrokarbon aromatik), kloroform serta aseton, umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap separasi dan tahap pemurnian (Fraksinasi).<sup>41</sup> Secara garis besar ada dua macam metode ekstraksi yaitu ekstraksi dengan bahan pelarut dan ekstraksi dengan cara destilasi.<sup>44</sup>

#### **2.6.2.1 Ekstraksi dengan Menggunakan Bahan Pelarut**

Ekstraksi menggunakan bahan pelarut terbagi 2 cara yaitu : cara dingin dan panas. Cara dingin dapat dilakukan dengan tehnik maserasi (perendaman) dan perkolasi (pengaliran), dan cara panas dapat dilakukan dengan cara *refluks*, *soxhlet*, *digesti*, *infundasi* dan *dekotasi*.<sup>119,121</sup>

Maserasi (perendaman) merupakan metode ekstraksi bahan alam dengan pelarut yang dilakukan dengan cara pendinginan (*cold processing*). Metode ini dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan pelarut. Cairan pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif dalam sel dengan luar sel, maka larutan yang terpekat di dalam sel akan terdesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan dalam sel.<sup>121</sup>

Maserasi digunakan untuk ekstraksi simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan pelarut.<sup>41</sup> Cairan pelarut dapat berupa air, etanol, air-etanol atau pelarut lain. Pengekstrakan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan dan pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Keuntungan cara ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan, namun kekurangannya adalah waktu pengerjaan lama dan penyarian kurang sempurna.<sup>119, 121</sup>

Maserasi dapat dilakukan modifikasi seperti remaserasi. Remaserasi berarti pengulangan penambahan pelarut pada ampas setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya.

Perkolasi (pengaliran) adalah ekstraksi yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Pada perkolasi, cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk simplisia, sehingga cairan penyari akan melarutkan zat aktif sel yang dilalui sampai mencapai keadaan jenuh. Ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan.<sup>119</sup> Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak), terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali bahan.

Selain cara dingin, penyarian simplisia dapat dilakukan menggunakan bantuan panas, dengan tujuan untuk mempercepat proses ekstraksi karena pelarut akan lebih cepat masuk dan keluar dari sel simplisia. Ekstraksi panas hanya dapat dilakukan untuk senyawa yang termostabil. Ada 5 cara ekstraksi panas : *refluks*, *soxhlet*, *digesti*, *infundasi*, *dekotasi*.<sup>111, 121</sup>

*Refluks* adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna.<sup>111, 121</sup>

*Soxhlet* adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Salah satu keuntungan dari ekstraksi ini adalah prosesnya, ekstrak akan langsung terpisah dengan simplisia.<sup>111,121</sup>

*Digesti* adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar) secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C.<sup>111</sup>

*Infundasi* atau infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98 °C selama waktu tertentu (15-20 menit). Infundasi terutama digunakan untuk mengekstraksi senyawa pada jaringan lunak seperti daun, bunga.<sup>111</sup>



Dekoktasi adalah infundasi dengan waktu lebih lama ( $\geq 30$  menit), dari  $30^{\circ}\text{C}$  sampai titik didih air. Dekoktasi terutama digunakan untuk mengekstraksi senyawa pada batang dan akar.<sup>111</sup>

### 2.6.2.2 Ekstraksi dengan Destilasi Uap

Destilasi uap adalah cara ekstraksi untuk senyawa yang mempunyai kandungan mudah menguap (minyak atsiri). Bahan segar atau simplisia diekstraksi dengan uap air berdasarkan peristiwa tekanan parsial senyawa kandungan menguap dengan fase uap air dari ketel secara kontinu sampai sempurna. Kemudian diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran (senyawa kandungan menguap ikut terdestilasi) menjadi destilat air bersama senyawa kandungan yang memisahkan sempurna atau sebagian.<sup>111,121</sup>

### 2.6.2.3 Ekstraksi dengan Cara Lain

Ekstraksi dengan cara lain dapat dilakukan dengan tehnik ekstraksi berkesinambungan, superkritikal karbondioksida, ekstraksi ultrasonik, dan ekstraksi energi listrik. Ekstraksi berkesinambungan merupakan proses ekstraksi dilakukan berulang kali dengan pelarut yang berbeda atau resirkulasi cairan pelarut dan prosesnya tersusun berurutan beberapa kali. Tujuannya untuk meningkatkan efisiensi (jumlah pelarut) dan dirancang untuk bahan dalam jumlah besar yang terbagi dalam beberapa bejana ekstraksi.<sup>111</sup>

Superkritikal karbondioksida merupakan suatu proses ekstraksi yang dilakukan untuk ekstraksi serbuk simplisia dan umumnya digunakan gas karbondioksida. Dengan menggunakan tekanan dan temperatur akan diperoleh spesifikasi kondisi polaritas tertentu yang sesuai untuk melarutkan golongan senyawa kandungan tertentu. Penghilangan cairan pelarut mudah dilakukan karena karbondioksida menguap dengan mudah sehingga langsung diperoleh ekstrak.

Ekstraksi ultrasonik merupakan proses ekstraksi menggunakan getaran ultrasonik ( $> 20.000$  Hz) memberikan efek pada proses ekstrak dengan prinsip meningkatkan permeabilitas dinding sel, menimbulkan gelombang spontan (*Cavitation*) sebagai stres dinamik serta menimbulkan fraksi interfase. Hasil ekstraksi tergantung pada frekuensi getaran, kapasitas alat dan lama proses ultrasonikasi.

Ekstraksi energi listrik merupakan proses ekstraksi menggunakan energi listrik yang digunakan dalam bentuk medan listrik, medan magnet serta *electric-discharges* yang dapat mempercepat proses dan meningkatkan hasil dengan prinsip menimbulkan gelembung spontan dan menyebarkan gelombang tekanan berkecepatan ultrasonik.<sup>121</sup>

## 2.7 Penetapan Parameter Standar Ekstrak

Terdapat dua parameter dalam standarisasi ekstrak yaitu parameter standar non spesifik dan spesifik.<sup>42</sup>

### 2.7.1 Parameter Non spesifik.

Pada parameter non spesifik ini dilihat parameter yang diperbolehkan yang mencakup: susut pengeringan, bobot jenis, kadar air dan kadar abu. Susut pengeringan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada temperatur 105°C selama 30 menit atau sampai berat konstan, yang dinyatakan dalam persen. Susut pengeringan identik dengan kadar air, dengan tujuan memberikan batas minimal atau rentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan.<sup>41,111</sup>

Bobot jenis adalah massa per satuan volume pada suhu kamar tertentu (25°C) yang ditentukan dengan alat khusus piknometer atau alat lainnya. Tujuannya adalah memberikan batasan tentang besarnya massa per satuan volume yang merupakan parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat (kental) yang masih dapat dituang. Hal ini memberikan gambaran kandungan kimia terlarut.<sup>111</sup>

Kadar air adalah pengukuran kandungan air yang berada di dalam bahan, dilakukan dengan cara yang tepat seperti titrasi, destilasi atau gravimetri. Tujuannya memberikan batas minimal atau rentang besarnya kandungan air di dalam bahan.<sup>111</sup>

Kadar abu adalah pengukuran kadar unsur mineral dan anorganik sebagai hasil pemanasan bahan pada temperatur yang menyebabkan senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap. Tujuannya adalah memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak.<sup>42,111,119</sup>

### 2.7.2 Parameter Spesifik

Parameter spesifik terdiri dari identitas organik, organoleptik serta kadar senyawa larut dalam pelarut tertentu. Identitas adalah deskripsi tata nama yang

meliputi nama ekstrak (generik, dagang, paten), nama latin tumbuhan (sistematika botani), bagian tumbuhan yang digunakan (rimpang dan daun), nama Indonesia, senyawa identitas ekstrak (senyawa tertentu yang menjadi petunjuk spesifik dengan metode tertentu). Tujuannya adalah memberikan identitas obyektif dari nama dan kespesifikan dari senyawa identitas.<sup>111,120</sup>

Organoleptik adalah pendeskripsian bentuk, warna, bau, rasa dengan menggunakan pancaindra.<sup>41</sup> Bentuk dapat berupa padat, serbuk kering, kental, cair. Warna dapat berupa kuning, coklat, merah dan lain-lain. Bau dapat berupa aromatik atau tidak berbau dan lain-lain. Rasa dapat berupa pahit, manis, kesat dan lain-lain. Tujuannya adalah untuk pengenalan awal yang sederhana seobyektif mungkin.<sup>111</sup>

## 2.8 Uji Sensitivitas Bakteri

Tes sensitivitas bakteri dapat dilakukan dengan banyak metode. Pada umumnya digunakan 2 metode yaitu metode dilusi (*dilution method*) dan metode difusi (*disc with drug in solid media method*).<sup>122</sup>

### 2.8.1 Metode Dilusi

Pada awalnya metode difusi dikembangkan oleh Bauer dkk. (1966 cit Baker dkk. 1991).<sup>124</sup> Metode dilusi digunakan untuk menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari suatu obat antimikroba. Uji kadar hambat minimal (KHM) adalah uji untuk mengetahui konsentrasi minimum atau terendah bahan uji yang masih menghambat pertumbuhan mikroorganisme di dalam tabung (*in vitro*), dan merupakan konsentrasi antibakteri yang masih efektif untuk mencegah pertumbuhan patogen dan mengindikasikan dosis yang efektif dalam mengontrol infeksi.<sup>122,123</sup>

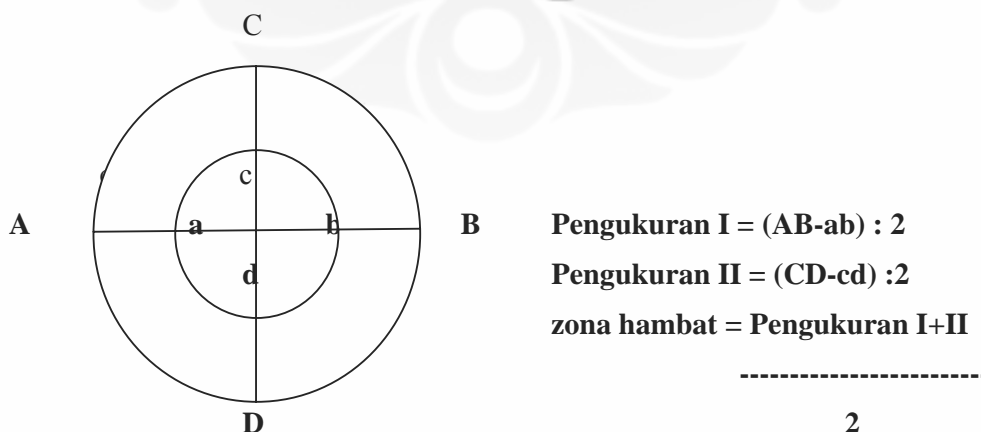
Prinsip dari metode dilusi ini adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Setelah itu masing-masing tabung diuji dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Seri tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari obat. Metode dilusi kemudian dilanjutkan dengan pembiakan ulang atau subkultur pada media agar darah guna menentukan nilai

kadar bunuh minimal (KBM), yaitu konsentrasi terendah obat yang ditunjukkan dengan tidak terdapatnya pertumbuhan koloni mikroba. Nilai KBM ditentukan sebagai konsentrasi bahan uji yang membunuh 99.9% melalui tes mikroorganisme pada perbenihan asli.<sup>122</sup>

### 2.8.2 Metode Difusi (*Disc with Drug in Solid Media*)

Metode difusi pada awalnya dikembangkan oleh Bauer dkk. (1966 cit Baker dkk. 1991) sehingga metode difusi sering disebut sebagai *Kirby-Bauer test*.<sup>124</sup> Kemudian metode ini dikembangkan oleh *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.<sup>124</sup> Prinsip dari metode difusi adalah antimikroba diletakkan ke dalam cakram kertas (*disc blank*). Cakram kertas yang mengandung obat tertentu ditanamkan pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba uji. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya daerah jernih di sekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan. Diameter zona hambat bisa dihitung dengan penggaris atau jangka sorong (*calliper*) dalam satuan mm. Diameter zona hambat merupakan pengukuran Kadar Hambat Minimum (KHM) secara tidak langsung dari zat antibakteri terhadap mikroba. Ukuran dari zona hambat dapat dipengaruhi oleh kepadatan atau viskositas dari media biakan, kecepatan difusi zat antibakteri, konsentrasi zat antibakteri, sensitivitas mikroorganisme terhadap zat antibakteri dan interaksi zat antibakteri dengan media.<sup>122,123,124</sup>

Cara pengukuran zona hambat dapat dilihat pada gambar 2.5<sup>122,123</sup>



Gambar 2.5 Pengukuran Zona Hambat<sup>124</sup>

## 2.9 Uji Toksisitas Obat

Ilmu toksikologi adalah ilmu yang mempelajari berapa besar dampak buruk dari senyawa-senyawa yang berbahaya (toksikan) dan bagaimana mekanismenya. Toksikan dapat terdistribusi ke berbagai bagian tubuh karena penyerapan oleh saluran pencernaan, saluran pernapasan, dan kulit, melalui 4 mekanisme yaitu : difusi pasif, filtrasi, transport yang difasilitasi, dan proses fagositosis. Kecepatan distribusi zat dalam tubuh dipengaruhi oleh sel (fagositosis). Kecepatan distribusi zat dalam tubuh dipengaruhi oleh aliran darah ke dalam organ, kemudian zat menyeberangi dinding kapiler dan membran sel, dan afinitas organ terhadap zat.<sup>125,126</sup>

Zat kimia di dalam tubuh akan menjalani biotransformasi di hati, paru-paru, lambung, usus, kulit dan ginjal. Metabolit yang terbentuk bisa bersifat tidak aktif lagi dan toksisitasnya berkurang (detoksifikasi) atau bersifat lebih toksik (bioaktivitas). Setelah diabsorpsi dan didistribusikan di dalam tubuh, toksikan dikeluarkan dalam berbagai bentuk-bentuk toksikan dapat berupa bentuk asal, metabolit atau konjugasi yang dikeluarkan melalui urin atau di simpan dalam hati.<sup>125,126</sup>

Di dalam tubuh. Efek toksik suatu zat dalam tubuh dibedakan berdasarkan sifat, organ sasaran dan mekanisme kerja. Efek toksik terjadi karena ada interaksi biokimia antara toksikan atau metabolitnya dengan struktur reseptor di dalam tubuh. Efek toksik ditentukan oleh dosis, lamanya pajanan dan faktor-faktor yang kurang nyata seperti faktor spesies dan strain hewan, jenis kelamin, umur, gizi dan hormonal dan faktor lingkungan. Organ sasaran toksikan adalah suatu sistem pernafasan, hati, ginjal, kulit, mata, susunan saraf dan sistem reproduksi.<sup>125,126</sup>

Uji toksisitas terdiri dari uji toksisitas umum (akut, subakut atau subkronis dan kronis) dan uji toksisitas khusus (teratogenik, mutagenik dan karsinogenik). Dalam uji toksisitas obat tradisional perlu dibedakan antara pemakaian secara singkat (*short term use*) dan yang dipakai dalam jangka waktu lama (*long term use*). Pada *short term use* diperhatikan toksisitas akut, sedangkan pada *long term use* perlu diteliti juga toksisitas subkronis dan kronis. Uji-uji lain seperti uji teratogenik, karsinogenik, dan lain-lain disesuaikan dengan indikasi obat tradisional yang bersangkutan.<sup>44</sup>

Tujuan uji toksisitas umum adalah untuk penetapan potensi toksisitas akut (LD<sub>50</sub>), penilaian gejala klinis, penentuan spektrum efek toksik, dan mekanisme kematian. Tujuan uji toksisitas khusus adalah untuk penentuan sifat toksisitas dan penetapan NOEL (*No Observed Effect Level*).<sup>43</sup>

Uji toksisitas akut adalah uji toksisitas suatu senyawa yang diberikan dalam dosis tunggal pada hewan percobaan, diamati selama 24 jam dan dilanjutkan selama 14 hari. Tujuan uji toksisitas akut adalah menentukan LD<sub>50</sub>. LD<sub>50</sub> adalah suatu dosis yang dapat menimbulkan kematian pada 50% hewan uji. Untuk menentukan LD<sub>50</sub> secara tepat, perlu dipilih dosis yang akan membunuh sekitar separuh jumlah hewan-hewan itu, dosis lain yang akan membunuh lebih dari separuh (>50%), serta dosis yang akan membunuh kurang dari separuh (<10%) dari hewan-hewan itu. *Weil* menyarankan penggunaan 5 hewan percobaan untuk tiap dosisnya, sedangkan *Bruce* menyarankan penggunaan 6-9 ekor hewan untuk setiap pengujian yang sederhana.<sup>126,127</sup>

Harga LD<sub>50</sub> diperoleh dengan berbagai metode statistik misalnya metode *C.I Bliss*, *Litchfield-Wilcoxon*, *Dixon-Massey* atau menggunakan metode *C. Weil*. Harga LD<sub>50</sub> ditentukan dengan metode statistik diperoleh dari kurva dengan menarik suatu garis mendatar dari titik angka kematian 50% pada ordinat sampai titik yang memotong kurva tersebut. Pada titik perpotongan tersebut ditarik garis vertikal, dan garis ini akan memotong absis pada titik LD<sub>50</sub> nya.<sup>126</sup>

Harga LD<sub>50</sub> (tabel 2.3) dapat digunakan untuk menentukan derajat toksisitas akut suatu zat, dengan klasifikasi sebagai berikut super toksik 5 mg/kg, amat sangat toksik 5-50 mg/kg, sangat toksik 50-500 mg/kg, toksisitas sedang 500-5000 mg/kg, toksisitas ringan 5000-15000 mg/kg, tidak toksik lebih besar dari 15000 mg/kg.<sup>126</sup>

Uji toksisitas sub kronis (1-3 bulan) atau kronis (3-6 bulan) bertujuan untuk menguji keamanan suatu zat. Uji toksisitas subakut mempelajari segala bentuk perubahan seperti akumulasi, toleransi, metabolisme dan kelainan khusus di organ. Untuk itu dilakukan pemeriksaan kimia darah, urin dan tinja.<sup>125,126</sup>

Tabel 2.3. Klasifikasi Derajat Toksisitas Akut

Kelas	LD 50 (mg/kgBB)
Supertoksok	5
Amat sangat toksik	5-50
Sangat toksik	50 - 500
Toksisitas sedang	500 - 5000
Toksisitas ringan	5000 - 15000
Praktis tidak toksik	> 15000

Lu FC. *Toksikologi Dasar : Asas, organ sasaran, dan penilaian resiko*. Penerjemah : Edi Nugroho. Ed ke-2. UI Press. 1995.<sup>126</sup>

Selain uji toksisitas akut dan toksisitas subkronis, untuk mengetahui efek toksik terhadap suatu obat tradisional yang akan diaplikasikan dalam rongga mulut perlu dilakukan uji toksisitas khusus yaitu untuk mengetahui efek toksik suatu obat tradisional terhadap sel epitel dan fibroblast dalam rongga mulut.

Pada uji toksisitas perlu diperhatikan rancangan percobaan, cara pemberian, dosis dan jumlah hewan uji, faktor lingkungan, pemeriksaan dan pengamatan. Setelah pemberian toksikan, jumlah hewan yang mati dan waktu kematiannya diamati dan tanda-tanda toksisitasnya dicatat (tabel 2.4.). Autopsi kasar harus dilakukan pada semua hewan yang mati dan beberapa hewan yang hidup pada akhir percobaan. Autopsi dapat memberikan informasi tentang organ sasaran dan perlu dilakukan histopatologik organ tubuh.<sup>126</sup>

Tabel 2.4 Tanda-Toksik Pada Organ dan Sistem

Sistem	Tanda-Tanda Toksik
Autonomik	membran niktitans, melemas, eksoftalmus, hipersekresi Hidung, salivasi, diare, keluar air seni, piloereksi
Perilaku	sedasi, gelisah, posisi duduk kepala ke atas, pandangan lurus ke depan, kepala tertunduk, depresi berat, sering menjilat-jilat tubuh, kuku siap mencakar, terengah-engah, iritabilitas, sikap agresif atau defensif, ketakutan, bingung, aktivitas aneh
Sensorik	peka terhadap nyeri, wrighting refleks, refleks kornea, refleks labirin, refleks penempatan, eflaks tungkai belakang, peka terhadap bunyi dan sentuhan, nistagmus, fonasi
Neuromuskuler	aktivitas meningkat atau berkurang, fasikulasi, tremor, konvulsi, ataksia, lemas, ekor melengkung ke atas membentuk huruf S (tanda Straub), kelemahan tungkai belakang refleks nyeri dan refleks tungkai belakang (hilang atau berkurang), opistotonus, tonus otot, kematian
Kardiovaskuler	denyut jantung meningkat atau berkurang, sianosis, vaso-konstriksi, vasodilatasi, perdarahan
Pernapasan	hipopnoe, dispnoe, terengah-engah, apnoe
Mata	midriasis, miosis, lakrimasi, ptosis, nistagmus, refleks pupil
Gastrointestinal Gastrourinary	salivasi, berdahak, diare, berak atau kencing berdarah, konstipasi, ingusan, muntah-muntah, kencing dan berak tidak terkendali
Kulit	piloereksi, menggigil, eritema, edema, nekrosis

Sumber : McNamara 1976 cit Lu (1995)<sup>126</sup>

Pemeriksaan efek toksisitas pada organ tubuh biasanya dilakukan pada organ hati dan ginjal. Hepatotoksitas suatu zat dihubungkan dengan beratnya kerusakan sel hati dan kegagalan mekanisme proteksi atau perlindungan tubuh. Secara garis besar, gambaran umum hati tikus menyerupai hati manusia, dimana terdapat struktur-struktur penting seperti vena sentralis dan sistem porta. Walaupun hati merupakan organ yang sel-selnya mengalami perubahan yang lambat, hati mempunyai regenerasi yang tinggi. Kehilangan jaringan hati akibat kerja zat-zat toksik atau pembedahan akan memacu sel-sel hati mulai membelah, dan hal tersebut terus berlangsung sampai perbaikan massa jaringan semula tercapai.<sup>127</sup>

Hati merupakan organ terbesar dan terberat dalam tubuh, dengan berbagai fungsi yang kompleks, seperti : ekskresi, sekresi (empedu), penyimpanan (lemak, vitamin A, vitamin B, glikogen), sintesis (fibrinogen, globulin, albumin, protrombin), fagositosis, detoksifikasi (obat-obat yang larut dalam lemak), konjugasi (bahan-bahan toksik, hormon steroid), esterifikasi (asam lemak menjadi trigliserida), metabolisme (protein, karbohidrat, lemak, hemoglobin dan obat) dan pembentukan sel darah merah.<sup>128</sup>

Secara histologis, struktur fungsional hati dibagi dalam 3 zona. Zona 1 terletak di sekitar portal, dengan sistem pendarahan yang paling baik. Dalam zona ini berlangsung proses utama fungsi hati yaitu metabolisme protein dan pembentukan protein plasma, sintesis glikogen, glikogenolisis serta proses konjugasi obat-obat tertentu. Zona 3 di sekitar vena sentralis dengan sistem pendarahan yang paling buruk. Dalam zona ini terjadi proses pembentukan lipid dan pigmen, metabolisme zat-zat kimia atau obat-obat tertentu, dan tempat penyimpanan glikogen. Zona 2 terletak di antara zona 1 dan 3 dengan sistem pendarahan yang lebih baik dibandingkan zona 3. Aktivitas biologis yang terjadi pada zona 2 merupakan gabungan zona 1 dan 3.<sup>128</sup>

Kerusakan sel hati akibat pemberian obat dengan dosis berlebih, terjadi terutama pada zona 3 dan zona 2 yaitu tempat dimana proses metabolisme obat berlangsung. Jenis kerusakan sel yang ditemukan dapat berupa kromatolisis, vakuolisasi hidropik, serta peleburan vena sentralis yang menandakan adanya kongesti, dan akibat pecahnya vena, dan di sekitar sinusoid berisi eritrosit. Jenis kerusakan lain adalah nekrosis sel hati.<sup>129</sup> Kerusakan hati akibat pemberian obat



dosisi berlebih yang bersifat akut dapat berupa bendungan (stenosis), nekrosis, apoptosis dan sebagainya.<sup>130</sup>

Bendungan hati (stenosis) dapat terjadi pada vena sentralis dan vena porta. Ciri khasnya adalah meluasnya diameter vena sentralis. Akibat bendungan, sirkulasi darah akan terganggu dan mengakibatkan sel-sel hati mengalami perlemakan, apoptosis, atau akan berlanjut pada nekrosis karena kekurangan nutrisi dan oksigen.<sup>127</sup>

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang terprogram, dimana jika sel tidak diperlukan lagi, atau sel tersebut sudah mengalami kerusakan berat, sehingga harus dieliminasi, memerlukan energi untuk pembuangan sel yang tidak diinginkan.<sup>131</sup>

Nekrosis adalah kematian sel dengan perubahan morfologi sebagai akibat terjadinya degradasi progresif oleh enzim pada sel yang mengalami jejas letal. Ada dua proses penting petunjuk nekrosis yaitu 1) pencernaan sel oleh enzim, dan 2) denaturasi protein. Tanda jelas kematian sel terdapat dalam inti : 1) kariolisis, kromatin basofil menjadi pucat akibat aktivasi DNA-ase pada penurunan pH sel, 2) piknosis yaitu penyusutan inti dan bertambah basofil akibat penggumpalan DNA, 3) karioreksis yaitu inti piknosis dan sebagian terfragmentasi.<sup>131</sup>

## **2.10 Hewan Coba**

Hewan coba atau sering disebut hewan laboratorium adalah hewan yang khusus diternakkan untuk keperluan penelitian biologik. Hewan laboratorium tersebut digunakan sebagai model untuk penelitian pengaruh bahan kimia atau obat pada manusia. Beberapa jenis hewan dari ukuran terkecil ke ukuran yang besar dan lebih kompleks digunakan untuk keperluan penelitian adalah mencit, tikus, kelinci dan kera.<sup>132</sup>

Di dalam penelitian eksperimental laboratorium, tikus sering dipakai sebagai hewan percobaan karena mudah untuk dikawinkan, reproduksi kontinyu di sepanjang kehidupannya di laboratorium, berukuran kecil, mudah dan praktis ditangani dan dapat dipelihara dalam jumlah besar tanpa membutuhkan area yang luas. Sebagai hewan kecil, tikus juga mempunyai aspek ekonomis dan praktis bila penelitian

membutuhkan jumlah yang besar untuk memberikan validitas statistik yang besar pada hasil penelitian.<sup>132</sup>

Telah banyak diketahui mengenai fisiologi, anatomi, genetik dan perilaku tikus, dan suatu hasil penelitian yang bermakna dengan subyek penelitian tikus jika dengan hati-hati diinterpretasikan dapat diekstrapolasi pada manusia. Tikus galur *Sprague-Dawley* saat ini paling populer untuk dijadikan hewan percobaan pada penelitian eksperimental.<sup>132</sup>

Menurut Adeghate (2002) rentang usia tikus disesuaikan dengan rentang usia pada manusia. Tikus berusia 3-5 bulan setara dengan manusia berusia 15-18 tahun, Tikus usia 9 bulan, 12 bulan, 20 bulan, dan 24 bulan setara dengan usia manusia 25-35 tahun, 35-50 tahun, 50-65 tahun, 65-75 tahun, dan 75-85 tahun.<sup>133</sup>

Ada 3 dasar etika penggunaan hewan coba yaitu *replacement* (mencakup berbagai metode yang memungkinkan mencapai tujuan penelitian tanpa menggunakan hewan coba), *reduction* (memperoleh informasi dengan menggunakan lebih sedikit hewan coba), dan *refinement* (penggunaan metode yang mengurangi rasa sakit, nyeri dan kerusakan pada hewan coba).<sup>132</sup>

Selain itu, penggunaan hewan coba perlu mengikuti kaidah *the five freedom of Animal Welfare* yang dikeluarkan oleh *Declaration of Helnsinki* (1964) yaitu : bebas dari rasa lapar dan haus, sakit dan penyakit, takut dan tertekan, bebas dari ketidaknyamanan, serta bebas dalam mengekspresikan perilaku.<sup>132</sup>

## 2.11 Mukosa Mulut

Mukosa mulut sebagai lapisan terluar yang menutupi permukaan rongga mulut, berfungsi melindungi jaringan dibawahnya terhadap stimulus dari luar. Mukosa mulut terdiri dari dua lapisan yaitu epitel dan jaringan ikat di bawahnya yaitu lamina propria.<sup>134,135</sup> Epitel pada mukosa mulut adalah epitel berlapis gepeng dan berkeratin, parakeratin dan tidak berkeratin bergantung pada lokasinya. Sebagian besar mukosa mulut dilapisi oleh epitel skuamosa berlapis yang tidak berkeratin kecuali gingiva, palatum durum dan bagian dorsal lidah.<sup>134,135</sup>

Epitel berkeratin terdiri atas empat lapisan yaitu: 1). Stratum basalis, sel-sel kuboid atau kolumnar dan membentuk satu lapisan yang terletak pada pertemuan antara epitel dan lamina propria, sel-sel basal menunjukkan aktivitas mitotik terbesar.; 2). Stratum spinosum biasa terdiri atas beberapa sel tebal dan gambaran

mitotik bisa terlihat pada lapisan yang berdekatan dengan lapisan sel basal. Stratum basalis dan lapisan pertama *stratum spinosum* disebut *stratum germinativum*. Zona ini menghasilkan sel epitel baru. Sel sel spinosum berbentuk seperti *polihedron* dengan tonjolan sel yang berdekatan bertemu, desmosom mengikat sel-sel bersama. Lapisan ini disebut juga *prickle cell layer*; 3). *Stratum granulosum* biasa terdiri dari sel-sel pipih, dan tersusun dalam lapisan setebal 3-5 sel. Pada lapisan ini epitel berkeratinnya lebih dominan daripada yang tidak berkeratin; 4). *Stratum korneum* biasa terdiri dari sel-sel pipih, tidak berinti dan dipenuhi filamen berkeratin yang dikelilingi oleh matriks. Sel-sel permukaan ini mengelupas dan diganti secara kontinyu oleh migrasi sel-sel dari lapisan di bawahnya. Epitel parakeratin dan non keratin memiliki empat lapisan, yaitu *stratum basalis*, *stratum spinosum*, *stratum intermedium* dan *stratum superfisialis*. Epitel para keratin memiliki sedikit filamen, sedangkan epitel non keratin tidak memiliki filamen.

*Lamina Propria* merupakan lapisan jaringan ikat tepat di bawah epitel, yang dapat dibedakan menjadi *papillary layer* dan *reticular layer*. *Lamina propria* terdiri dari : 1). Sel terdiri dari fibroblast, sel mast dan makrofag. Fibroblast merupakan sel jaringan ikat, merupakan penghasil utama matriks dan serat jaringan ikat. Sel mast merupakan sel yang besar, bulat atau lonjong dengan nukleus yang kecil dibandingkan dengan ukuran sel, dan makrofag (sebagai pertahanan penting, fagosit); 2). Serat terdiri dari serat kolagen, elastin dan oksitalan. Serat kolagen merupakan jenis serat yang paling banyak ditemukan pada jaringan ikat. Kolagen lamina propria selalu diperbaharui secara kontinyu oleh suatu proses “pembentukan ulang” melalui degradasi dan pembentukan. Serat elastin terdapat pada hampir semua bagian mukosa dan terutama banyak pada mukosa yang bergerak. Serat oksitalan hanya ditemukan pada jaringan periodontal, serat ini terdiri dari *fibrillar* dan *amorf*; 3). Matriks jaringan ikat dihasilkan oleh fibroblast, walaupun sel mast dapat membentuk juga. Matriks terdiri dari makromolekul, yang diklasifikasikan menjadi dua kelompok utama yaitu *proteoglycan* dan glikoprotein. <sup>134,135</sup>

Submukosa merupakan jaringan ikat yang tersusun dari sel dan elemen interseluler. Submukosa ditemukan pada pipi, bibir, dan palatum. Komponennya kurang padat dibandingkan lamina propria, berfungsi dalam nutrisi dan pertahanan. Pada lapisan ini ditemukan beberapa pembuluh darah besar, saraf, limfe, dan jaringan lemak. Submukosa juga banyak mengandung kelenjar mukosa kecil dan

kelenjar liur (labial) seromukosa, yang sekretnya menuju ke permukaan melalui duktus yang pendek.<sup>136</sup>

Permukaan mukosa mulut diliputi oleh epitel yang membentuk barrier yang lebih permeabel dibandingkan mukosa yang lain. Selain itu mukosa mulut juga mempunyai kemampuan untuk membatasi penetrasi toksin dan antigen-antigen yang dihasilkan oleh mikroorganisme di rongga mulut.<sup>137</sup>

Fungsi dasar mukosa adalah sebagai barrier, melanjutkan sensasi dari lingkungan luar, pengatur panas, dan medium disekresikannya saliva.<sup>138</sup> Epitel permukaan mukosa membentuk barrier utama terhadap berbagai keadaan fisik dan kimia. Mukosa mulut berbeda sedikit dari satu regio (daerah) ke regio lainnya. Berdasarkan struktur perbedaan regional, maka mukosa mulut dapat diklasifikasikan ke dalam tiga tipe yaitu : 1). Mukosa mastikasi atau pengunyahan melapisi palatum durum dan gingiva. Epitel pada mukosa ini adalah epitel berkeratin, yang berfungsi melindungi jaringan di bawahnya dari tekanan kunyah, sedangkan lamina propria berupa jaringan ikat kolagen padat dan tebal dengan vaskularisasi yang sedang. Jaringan ikat kolagen pada mukosa ini lebih tebal dan teratur dibandingkan dengan jaringan ikat kolagen pada mukosa penutup; 2). Mukosa penutup melapisi sebagian besar rongga mulut termasuk bibir, pipi, bagian dasar prosesus alveolaris, forniks, vestibulum, dasar mulut, permukaan ventral lidah dan palatum molle. Mukosa penutup bersifat fleksibel dan memungkinkan pembesaran rongga mulut dan adaptasi terhadap semua gerakan otot. Epitel pada mukosa ini adalah epitel skuamosa berlapis yang tidak berkeratin, sedangkan lamina proprianya terdiri dari serat kolagen yang elastis dan retikular. ; 3). Mukosa khusus, dimana epitel pada mukosa ini merupakan epitel yang berkeratin. Mukosa khusus menutupi permukaan dorsal lidah. Meskipun permukaan dorsal lidah ditutupi mukosa mastikasi, mukosa ini juga memiliki fungsi mekanik dan sensorik.

Jaringan ikat yang mendukung epitel disebut lamina propria, yang terdiri atas dua lapis dan mengandung pembuluh darah, saraf dan sel-sel, antara lain fibroblast, makrofak, sel mast dan sel-sel pertahanan tubuh (neutrofil, limfosit). Fibroblast adalah sel utama yang bertanggung jawab dalam memperbanyak substransi dasar pada jaringan ini, dan memainkan peran penting dalam mempertahankan integritas mukosa mulut.<sup>137</sup>

Pada umumnya antiseptik dibuat dalam bentuk sediaan obat kumur atau gel. Bentuk sediaan tersebut pada penggunaannya dalam rongga mulut akan berkontak dengan mukosa mulut dan gingiva, dimana gingiva akan menjadi target obat seperti pada perawatan gingivitis. Untuk mempelajari atau menganalisis efek toksik tersebut diperlukan uji toksisitas khusus yaitu efek obat terhadap sel epitel dan fibroblast.

## 2.12 Kultur Sel

Sel adalah struktur dasar dan unit fungsional terkecil dan kompleks yang menyusun suatu organ.<sup>139</sup> Kultur sel adalah proses dimana sel baik prokariotik dan eukariotik, ditumbuhkan dalam kondisi terkontrol. Kultur sel adalah upaya menumbuhkan sel yang dikondisikan pada suatu lingkungan buatan yang kondusif untuk pertumbuhannya.<sup>140</sup> Umumnya sel membutuhkan suatu permukaan padat untuk tumbuh dan membelah.<sup>139</sup> Sel memerlukan suplai nutrisi dan lingkungan yang steril untuk tumbuh, oleh karena itu sebaiknya lingkungan kultur mempunyai temperatur dan pH yang stabil.<sup>141</sup>

Kultur sel terbagi menjadi kultur sel primer dan kultur sel sekunder (*cell line*). Sel primer adalah sel yang diperoleh secara langsung dari pemisahan jaringan suatu organ melalui pemotongan jaringan normal dan dikultur.<sup>140,141</sup> Kultur primer ini hanya dapat dipertahankan dalam periode waktu tertentu, sedangkan galur sel (*cell line*) adalah keturunan sel yang diperoleh dari kultur sel primer dan telah dipisahkan secara enzimatik maupun secara mekanis.<sup>142</sup> Empat karakteristik sel yang dapat digunakan untuk mengevaluasi kultur sel adalah morfologi sel, kecepatan pertumbuhan, efisiensi pertumbuhan, dan fungsi khusus yang dilakukan sel.<sup>140</sup> Dalam kultur sel, dapat diamati berbagai perilaku, karakteristik, dan bentuk sel. Oleh karena itu, kultur sel memiliki kegunaan yang bervariasi, antara lain untuk pengamatan biokimia sel, uji toksisitas suatu bahan, penelitian kanker, deteksi dan isolasi suatu virus serta terapi gen.<sup>140</sup>

Keunggulan kultur sel adalah lingkungannya (pH, suhu, nutrisi pertumbuhan) mudah diatur, dapat menggambarkan karakteristik sel, mudah diukur, dan lebih etis daripada menggunakan hewan percobaan. Namun, kultur sel juga memiliki

keterbatasan seperti mudah terkontaminasi, ketidakstabilan genetik dan fenotip, serta biaya pemeliharannya yang relatif mahal.<sup>141,142</sup>

Sel yang digunakan untuk penelitian ini adalah sel sekunder (*cell line HaCat*) dan sel primer fibroblast. Sel *HaCat* diisolasi dari kulit manusia dan lazim digunakan dalam penelitian yang menunjukkan respon sel epitel mulut karena sel ini menunjukkan seluruh tampilan diferensiasi dan morfologi yang normal dari epitel seperti kondisi *in vivo*, dapat dikultur dengan mudah dan dapat disimpan dalam kultur untuk jangka waktu yang panjang.<sup>143</sup> Sel fibroblast *in vitro* diambil dari gingiva subepitel pada saat gingivektomi.<sup>144</sup>

Komposisi media kultur sel adalah sebagai berikut : DMEM, karbohidrat, serum dan antibiotik.<sup>141,142</sup> DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* adalah modifikasi dari *Basal Medium Eagle* (BME) yang berisi asam amino dan vitamin. D-MEM *high glucose* adalah D-MEM dengan tingkat konsentrasi glukosa 4500 mg/L. Komposisi lengkapnya adalah 4500 mg/L *glucosa*, *L-glutamine*, *sodium pyruvate*, dan *sodium bicarbonate*.<sup>141</sup>

Karbohidrat merupakan turunan dari gula. Konsentrasi karbohidrat beragam dari 1 g/L hingga 4.5 g/L.<sup>145</sup> Biasanya glukosa telah ditambahkan di dalam D-MEM. Serum merupakan campuran kompleks albumin, faktor pertumbuhan dan penghambat pertumbuhan, merupakan salah satu konstituen yang penting dalam media. Kualitas, tipe dan konsentrasi serum mempengaruhi pertumbuhan sel. Sebelum digunakan, sebaiknya serum dites dalam menghasilkan efisiensi *cloning*, efisiensi *plating* dan kemampuan menjaga karakter sel. Serum juga membantu melindungi sel terhadap bahaya mekanis saat pencampuran sel atau saat dipanen dengan *cell scraper*. Serum juga mampu berlekatan dan menetralkan racun. Dalam penggunaannya, serum harus diinkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit untuk menghilangkan kontaminasi beberapa jenis virus, khususnya *bovine viral diarrhoea virus* (BVDV) dan mikoplasma.<sup>139</sup> Salah satu contoh serum yang sering digunakan dalam kultur sel adalah *Fetal Bovine Serum* (FBS). FBS diambil dari serum fetus hewan dan tidak ada tambahan campuran kimia lainnya.<sup>146</sup>

Antibiotik biasanya ditambahkan ke dalam medium kultur, dengan tujuan untuk menjaga media kultur sel bebas dari bakteri tanpa membunuh sel kultur di dalamnya. Biasanya digunakan antibiotik *penicillin* dan *streptomycin* dengan

komposisi sodium klorida, *penicillin G sodium*, dan *Streptomycin Sulfate*.<sup>147</sup> Antibiotik ini dapat membunuh bakteri *aerob-anaerob*, *anaerob* dan jamur. *Penicillin G* akan mengganggu tahap akhir dari sintesis dinding sel, sedangkan *Streptomycin Sulfate* akan berlekatan dengan *sub unit 30S* menyebabkan salah pembacaan transkrip genetik. keduanya merupakan antibiotik spektrum luas (dapat membunuh bakteri Gram positif dan negatif).<sup>148</sup>

### **2.13 Uji toksisitas sel (sitotoksisitas) dengan *MTT Assay (4,5-Dimethylthiazol-2-yl), 2,5-diphenyltetrazolium bromide assay*.**

Sitotoksisitas merupakan derajat dimana suatu agen mempunyai aksi kerusakan spesifik dan derajat lisisnya sel tertentu oleh mekanisme imun. Viabilitas sel adalah kemampuan sel untuk dapat bertahan hidup dengan menunjukkan respon sel secara jangka pendek, seperti perubahan permeabilitas membran atau gangguan pada jalur metabolisme tertentu serta kemampuan sel untuk bertahan hidup terhadap paparan suatu agen toksik. Oleh karena itu, penurunan nilai viabilitas sel sering digunakan sebagai penanda sitotoksisitas suatu agen. Tes sitotoksisitas ini berfungsi untuk mengetahui efek toksik suatu bahan terhadap sel tertentu.<sup>148</sup>

Sitotoksisitas suatu bahan dapat diukur dengan berbagai macam cara, salah satunya dengan melalui penurunan proliferasi sel dan penurunan viabilitas sel. Salah satu tes sitotoksisitas yang sering digunakan untuk menilai viabilitas sel secara *in vitro* digunakan uji kolorimetrik melalui aktivitas enzim reduktase mitokondria sel hidup yang mereduksi senyawa *methylthiazol tetrazolium* (MTT). Uji ini disebut dengan *MTT Assay*.<sup>148,149</sup>

*MTT assay* adalah suatu uji laboratorium dan kolorimetrik standard (berdasarkan perubahan warna) untuk mengukur aktivitas enzim yang mereduksi MTT menjadi formazan ungu di mitokondria hidup, sehingga memberikan tampilan berwarna ungu. Reaksi tersebut dapat digunakan sebagai indeks viabilitas sel. Sel yang mati tidak akan mempunyai reaksi ini karena tidak mempunyai enzim *dehydrogenase* mitokondria. *MTT assay* juga dapat digunakan untuk menentukan potensial agen obat atau bahan lain yang bisa menyebabkan toksisitas sel, disfungsi metabolisme sel dan menurunkan kerja sel saat pengujian.<sup>150,151</sup>

Prinsip dasar *MTT assay* adalah mengukur aktivitas selular berdasarkan aktivitas *succinic dehydrogenase* mitokondria sel untuk mereduksi garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT). Pada proses metabolisme, sel-sel hidup menghasilkan *succinic dehydrogenase* mitokondria. Enzim ini bereaksi dengan garam *methylthiazol tetrazolium* (MTT) dan membentuk kristal formazan ungu yang jumlahnya sebanding dengan aktivitas sel yang hidup.<sup>151</sup>

Nilai absorbansi (OD) dari kristal formazan yang telah dilarutkan dapat diukur menggunakan spektrofotometer (*Elisa reader* atau *microplate reader*) dengan panjang gelombang 490 nm.<sup>155</sup> Penyerapan maksimal tergantung dari pelarut yang digunakan. Penyerapan ini terjadi hanya jika enzim reduktase mitokondria aktif. Oleh karena itu konversi dapat langsung berhubungan dengan viabilitas sel. Ketika jumlah formazan ungu diproduksi oleh sel yang mendapatkan perlakuan dibandingkan dengan sel kontrol yang tidak mendapatkan perlakuan, efektifitas agen yang menyebabkan formazan ungu yang larut dalam air, dapat dilarutkan dalam isopropanol yang diasamkan. Nilai absorbansi (OD) kristal ungu yang dihasilkan dapat diukur menggunakan spektrofotometer (*ELISA reader*).<sup>155</sup> Selanjutnya, viabilitas dinyatakan dengan membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan yang dipajan dengan bahan uji dengan kelompok kontrol (sampel tanpa bahan uji) menggunakan rumus dari *In Vitro Technologies* sebagai berikut :

$$\text{Viabilitas sel (\% dari kontrol)} = \frac{\text{Nilai absorbansi kelompok perlakuan}}{\text{Nilai absorbansi kelompok kontrol}} \times 100\%$$

#### 2.14 Uji Biofilm dengan *Crystal Violet*

*Crystal violet* merupakan salah satu zat senyawa *triethylmethane* yang sering digunakan dalam pewarnaan Gram dan memiliki efek antibakteri serta antijamur. *Crystal violet* ditemukan oleh Hans Christian Gram pada tahun 1884. *Crystal violet* memiliki nama kimia *Tris(4-(dimethylamino)phenyl) methylum chloride* dan memiliki gugus hidroksil.<sup>156,157</sup>

Dalam pewarnaan Gram, *crystal violet* merupakan pewarna primer yang mewarnai dinding sel bakteri (peptidoglikan). Peptidoglikan pada bakteri Gram negatif lebih tipis sehingga mudah melepas zat warna *crystal violet* dibandingkan



pada Gram positif. Dalam larutan air, *crystal violet* terurai menjadi CV<sup>+</sup> dan CI<sup>-</sup>. CV<sup>+</sup> kemudian menembus dinding sel bakteri yang bersifat negatif dan memberi warna ungu pada bakteri tersebut.<sup>151,152</sup>

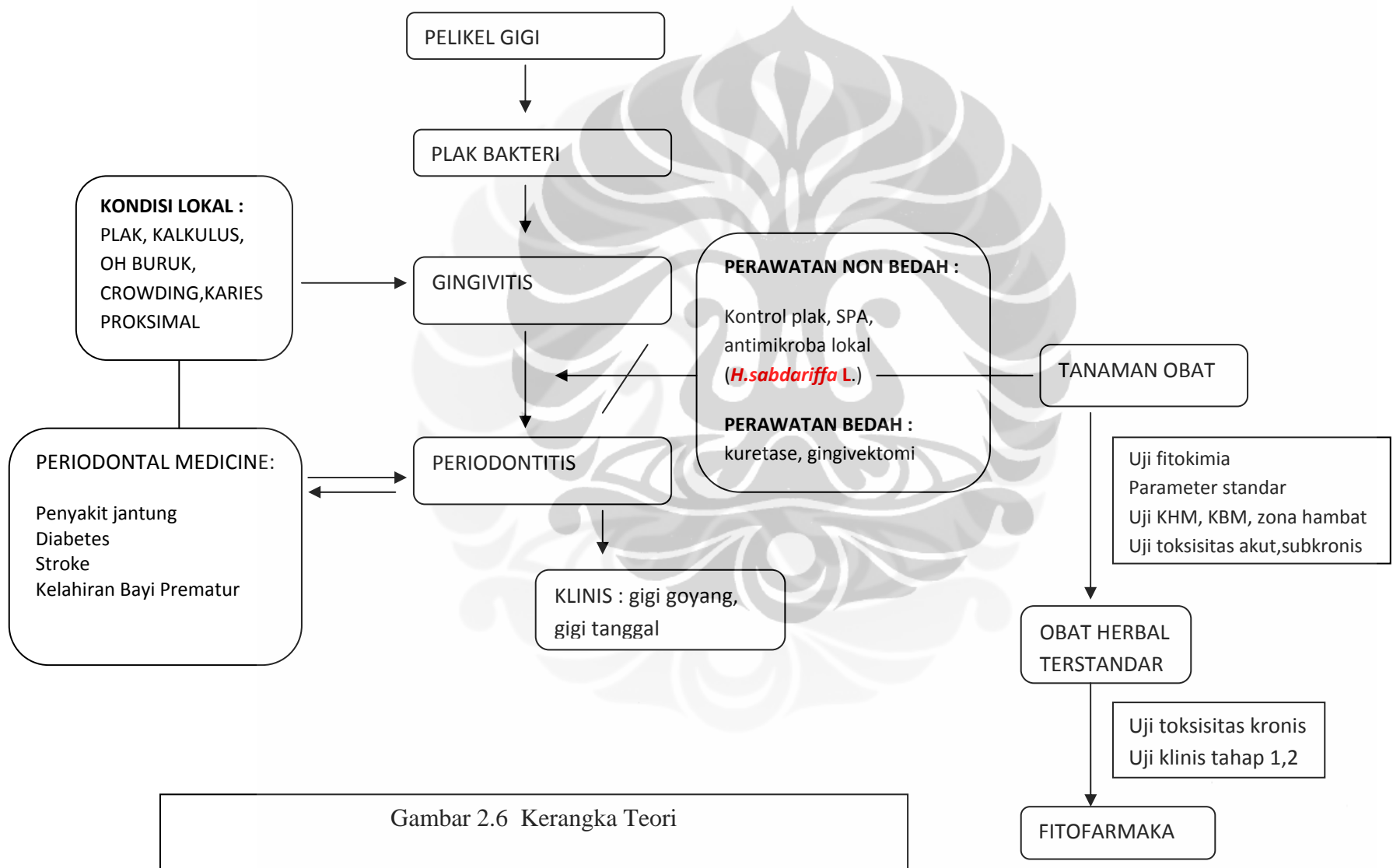
Dalam pewarnaan Gram, diskolorasi dilakukan dengan menambahkan alkohol atau etanol. Larutan ini akan berinteraksi dengan lipid pada membran sel. Pada bakteri Gram negatif, peptidoglikan akan terpajan larutan ini sehingga warna ungu akan dengan mudah hilang. Namun pada bakteri Gram positif, dehidrasi akibat pajanan ini membuat warna ungu semakin terperangkap pada peptidoglikan. Akan tetapi, lama pajanan terhadap larutan diskolorasi harus tepat. Apabila dipajankan terlalu lama, warna ungu pada kedua jenis bakteri akan dengan mudah larut dalam etanol.<sup>158</sup>

## 2.15 Kerangka Teori

Etiologi utama Penyakit Periodontal adalah plak bakteri. Dengan faktor predisposisi lokal dan sistemik, maka plak bakteri dapat menyebabkan terjadinya gingivitis, dan bilamana tidak dilakukan perawatan dapat berlanjut menjadi periodontitis. Keadaan periodontitis yang berlanjut dapat mengakibatkan kegoyangan gigi dan berakibat tanggalnya gigi. Periodontitis kronis sering dikaitkan dengan *periodontal medicine*, berbagai kondisi sistemik dapat meningkatkan kerentanan penyakit periodontal, dan adanya infeksi periodontal dapat menjadi faktor resiko kondisi sistemik. Adapaun kondisi sistemik tersebut seperti penyakit kardiovaskular, stroke, diabetes melitus, kelahiran bayi prematur, osteoporosis.

Perawatan gingivitis dapat berupa perawatan bedah dan non bedah. Perawatan non bedah meliputi kontrol plak, skeling, pemberian antimikroba lokal, sedangkan perawatan bedah meliputi kuretase dan gingivektomi. Pemberian antimikroba lokal dapat berupa obat kumur sintetik atau herbal. Salah satu yang akan dikembangkan dari tanaman obat adalah kelopak bunga *H. sabdrariffa* L. Adapun tahapan pengembangan tanaman obat dimulai dari tahap seleksi tanaman menjadi tanaman obat, lalu berkembang menjadi obat herbal terstandar dan kemudian menjadi fitofarmaka. Tahap dari tanaman obat menjadi obat terstandar meliputi uji fitokimia, parameter standar, uji khasiat, uji keamanan berupa toksisitas akut, subkronis. Pada tahap obat herbal terstandar dilakukan pembuatan sediaan, uji keamanan kronis serta dilakukan uji klinis tahap 1 dan 2 (gambar 2.6.).

## KERANGKA TEORI



Gambar 2.6 Kerangka Teori

## BAB 3

### KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

**3.1.1** Pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dilakukan uji skrining fitokimia sehingga dibuktikan adanya kandungan senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. (gambar 3.1.).



Gambar 3.1. Skrining Fitokimia

**3.1.2** Pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dikarakterisasi sehingga dapat ditetapkan nilai parameter standar untuk *H. sabdariffa* L. (gambar 3.2.).



Gambar 3.2. Penetapan Parameter Standar

**3.1.3** Pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dilakukan uji pada *S. sanguinis* melalui uji KHM, KBM dan zona hambat sehingga diketahui khasiat anti bakteri (gambar 3.3.)



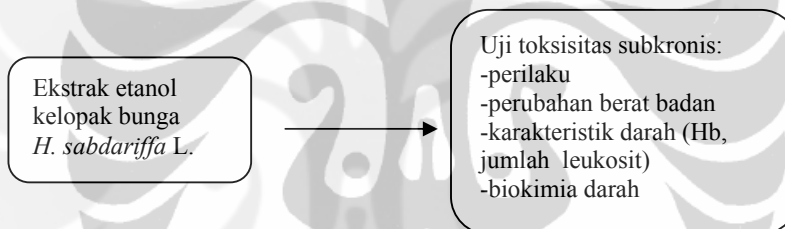
Gambar 3.3. Uji KHM, KBM, Zona Hambat

3.1.4 Pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. pada tikus diuji toksisitas akut, sehingga diperoleh LD<sub>50</sub> (gambar 3.4.).



Gambar 3.4. Uji Toksisitas Akut

3.1.5 Pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. pada tikus diuji toksisitas subkronis, sehingga diketahui efek terhadap sistem fisiologi dan motorik (gambar 3.5.).



Gambar 3.5. Uji Toksisitas Subkronis

3.1.6 Pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dilakukan uji toksisitas khusus (sitotoksisitas) pada sel epitel dan fibroblast melalui uji MTT (gambar 3.6.).



Gambar 3.6. Uji Sitotoksisitas

3.1.7 Pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dilakukan uji potensi pertumbuhan terhadap *S. sanguinis*, sehingga diketahui efektivitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam menurunkan viabilitas *S. sanguinis* dalam *biofilm* (gambar 3.7.).



Gambar 3.7. Uji *Biofilm*

## 3.2 Hipotesis

- 3.2.1. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai golongan senyawa aktif yang bersifat sebagai antibakteri.
- 3.2.2. Parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat ditetapkan.
- 3.2.3. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai daya antibakteri terhadap *S. sanguinis* dengan menggunakan uji KHM, KBM dan zona hambat.
- 3.2.4. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman, tidak toksik terhadap organ vital tikus *Sprague-Dawley* dalam jangka waktu pendek (toksisitas akut).
- 3.2.5. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman, tidak toksik terhadap organ vital tikus *Sprague-Dawley* dalam jangka waktu panjang (toksisitas subkronis).
- 3.2.6. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak toksik pada sel epitel dan fibroblast.
- 3.2.7. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm* secara *in vitro*.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

4.1.1 Analisis Golongan senyawa kimia ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Metode penelitian ini adalah eksperimental laboratorium untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang bersifat sebagai antibakteri.

4.1.2 Uji Parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Metode penelitian ini adalah eksperimental laboratorium untuk mengetahui parameter standar baik parameter non spesifik (susut pengeringan, bobot jenis, kadar air, kadar abu) serta parameter spesifik (identitas, organoleptik).

4.1.3 Uji Antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berbagai konsentrasi terhadap *S. sanguinis* berdasarkan uji Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dan zona hambat. Metode penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Ekstrak diuji dalam 5 konsentrasi (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%).

4.1.4 Uji Toksisitas Akut ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Metode penelitian ini adalah eksperimental laboratorium untuk mengetahui apakah ekstrak kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman terhadap tubuh secara sistemik, dalam pemakain jangka pendek setelah diuji pada tikus *Spraque-Dawley*

4.1.5 Uji Toksisitas Subkronis ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Metode penelitian ini adalah eksperimental laboratorium untuk mengetahui apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman terhadap tubuh secara sistemik, dalam pemakaian jangka panjang setelah diuji pada tikus *Spraque-Dawley*

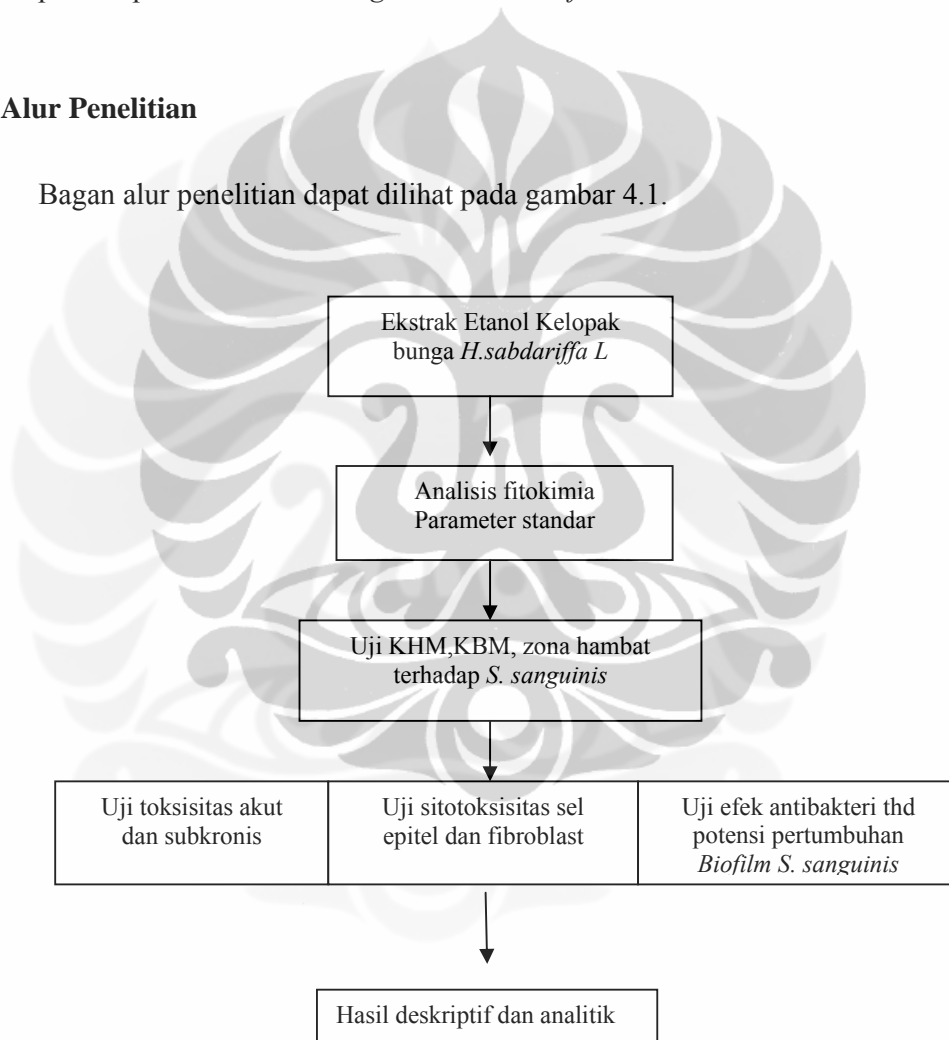
4.1.6 Uji Sitotoksisitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L terhadap sel epitel dan fibroblast. Metode penelitian ini adalah eksperimental laboratorium, dilakukan pada sel epitel dan sel fibroblast. Penelitian ini untuk menentukan

keamanan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap sel epitel dan fibroblast.

- 4.1.7 Uji efektivitas antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm*. Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dilakukan *in vitro*, untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm*.

## 4.2. Alur Penelitian

Bagan alur penelitian dapat dilihat pada gambar 4.1.



Gambar 4.1. Bagan Alur Penelitian

### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

#### **4.3.1 Tempat Penelitian**

4.3.1.1 Identifikasi tanaman di *Herbarium Bogoriense* bidang Botani Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Bogor.

4.3.1.2 Pembuatan ekstrak etanol dan uji fitokimia di di Balai Tanaman Obat dan Aromatik (Ballitro) Bogor.

4.3.1.3 Uji Standarisasi ekstrak bunga *H. sabdariffa* L. di Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. Cimanggu, Bogor.

4.3.1.4 Uji KHM, KBM dan zona hambat di Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

4.3.1.5 Uji Toksisitas akut dan subkronis di Laboratorium Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

4.3.1.6 Uji Sitotoksisitas di Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

4.3.1.7 Uji Efek antibakti ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap potensi pertumbuhan *biofilm* *S. sanguinis* di Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

#### **4.3.2 Waktu Penelitian**

Penelitian dimulai 1 Maret 2011 – 31 Maret 2012

### **4.4 Material dan Subyek Penelitian**

4.4.1 Material : kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang telah dikeringkan dan digiling menjadi serbuk, sel *HaCat* dan sel primer fibroblast

4.4.2 Subyek Penelitian : *S. sanguinis*, tikus *Sprague-Dawley* jantan usia 3 bulan, berat badan 150 - 170 g. Tikus diperoleh dari Balai Pengembangan Obat dan Makanan.



#### 4.5 Besar Sampel Penelitian

- 4.5.1 Uji KHM, KBM, zona hambat terhadap *S. sanguinis* (*in vitro*) dilakukan tiga kali pengulangan eksperimen terpisah (*independent*) dan setiap kali eksperimen dilakukan *triplo*.
- 4.5.2 Uji Toksisitas Akut pada tikus (*in vitro*) digunakan 5 ekor tikus dengan dosis terbesar.
- 4.5.3 Uji Toksisitas Subkronis pada tikus (*in vitro*) digunakan 40 ekor tikus.
- 4.5.4 Uji Sitotoksisitas terhadap sel epitel dan fibroblast dilakukan tiga kali pengulangan eksperimen terpisah (*independent*) dan setiap eksperimen dilakukan *duplo*.
- 4.5.5 Uji Efektifitas ekstrak terhadap potensi pertumbuhan *biofilm S. sanguinis* dilakukan tiga kali pengulangan eksperimen terpisah (*independent*) dan setiap eksperimen dilakukan *triplo*.

#### 4.6 Identifikasi Variabel

##### 4.6.1 Analisis Fitokimia

Variabel bebas pada analisis fitokimia adalah simplisia kelopak bunga *H. sabdariffa* L yang diekstraksi dengan etanol 70%. Variabel tergantung berupa golongan senyawa fitokimia aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L yang memiliki khasiat antibakteri

##### 4.6.2 Parameter Standar

Variabel bebas pada parameter standar adalah simplisia kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang diekstraksi dengan etanol 70%. Variabel tergantung berupa pemeriksaan parameter non spesifik meliputi susut pengeringan, bobot jenis, kadar air dan kadar abu, serta parameter spesifik meliputi identitas, organoleptik.

##### 4.6.3 Uji kadar hambat minimal (KHM), kadar bunuh minimal (KBM) dan zona hambat Terhadap *S. sanguinis*

Variabel bebas pada uji KHM, KBM, dan zona hambat adalah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam 7 kali pengenceran (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,65%, 0,78%). Variabel tergantung berupa nilai KHM,

KBM dan zona hambat dari ekstrak etanol terhadap bakteri *S. sanguinis* galur ATCC 10556, untuk mendapatkan konsentrasi terapeutik. Sebagai variabel terkendali adalah bakteri *S. sanguinis* galur ATCC 10556, dalam perbenihan *Thioglycollate broth*, diisolasi di dalam sungkup anaerobik.

#### 4.6.4 Uji Toksisitas Akut pada Tikus *Sprague-Dawley*

Variabel bebas pada uji toksisitas akut adalah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dimulai dosis tertinggi yaitu 15 g/kg BB tikus. Variabel tergantung berupa kematian tikus *Sprague-Dawley* setelah diberi ekstrak etanol dosis 15 g/kg BB, melalui pengamatan selama 14 hari. Sebagai variabel terkendali adalah ruangan dengan kondisi yang sama untuk setiap tikus. Pemeliharaan hewan diawasi secara ketat. Ruangan hewan memenuhi persyaratan seperti suhu, kelembaban, cahaya, dan kebisingan sesuai kebutuhan hidup hewan uji, serta ruangan yang terjaga kebersihannya.

#### 4.6.5 Uji Toksisitas Subkronis pada Tikus

Variabel bebas pada uji toksisitas subkronis adalah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dibagi dalam 4 kelompok yaitu dosis maksimum, menengah, rendah dan kontrol. Variabel tergantung berupa pengamatan perilaku, perubahan berat badan, pemeriksaan karakteristik darah, pemeriksaan biokimia darah, pengamatan histopatologi organ hati dan ginjal. Sebagai variabel terkendali adalah ruangan dengan kondisi yang sama. Pemeliharaan hewan diawasi secara ketat. Ruangan hewan memenuhi persyaratan, seperti suhu, kelembaban, cahaya, dan kebisingan sesuai kebutuhan hidup hewan uji, serta ruangan yang terjaga kebersihannya. tikus jantan dan betina dipisahkan.

#### 4.6.6 Uji Sitotoksisitas Terhadap Sel Epitel dan Sel Primer Fibroblast

Variabel bebas pada uji sitotoksisitas adalah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berbagai konsentrasi (0,2%, 0,8%, 1,6%, 3,2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%). Variabel tergantung berupa viabilitas sel epitel dan sel fibroblast setelah diberi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L., dinyatakan dalam % terhadap kontrol. Sebagai variabel terkendali adalah kondisi lingkungan yang steril. Media *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

(DMEM) 10% yang mengandung 10 ml *Fetal Bovine Serum* (FBS); 2 mL *penstrep*; 0.5 mL *fungizone (amfoterisin B)* pH 7.2–7.4 dan dimasukkan ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C kelembaban 95%.

#### 4.6.7 Uji efektifitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap Potensi Pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm* (uji *biofilm*)

Variabel bebas pada uji *biofilm* adalah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam berbagai konsentrasi (0,2%, 0,8%, 1,6%, 3,2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%). Variabel tergantung berupa penurunan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm*.

### 4.7 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1.	Ekstrak etanol Kelopak bunga <i>H.sabdariffa</i> L.	Bahan diperoleh dari ekstraksi etanol dengan maseksi menggunakan etanol dan di evaporasi dengan <i>rotary evaporator</i>	labu pisah <i>Rotary evaporator</i>	serbuk dimasukkan labu, diberi etanol 70%, aduk, diamkan 3 hari, saring, uapkan, dengan <i>rotary evaporator</i> , didapat ekstrak kental	gram	numerik
2.	Kandungan Golongan Senyawa Kimia	Uji terhadap kandungan senyawa <i>H. sabdariffa</i> L meliputi flavonoid, steroid, saponin triterpenoid, tanin	skrining fitokimia	mencampurkan bahan pereaksi ke dalam ekstrak diperoleh hasil sesuai indikator penanda senyawa	jenis senyawa	nominal
3.	Parameter Standarisasi Ekstrak	Uji parameter standar ekstrak diperoleh dari penghitungan parameter spesifik (identitas, organoleptik) dan parameter non spesifik (susut kering, bobot jenis, kadar air, kadar abu)	visual timbangan	mengamati secara organoleptik dan menimbang ekstrak sesudah diuji	gram/mL persen	numerik

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
4.	Nilai kadar Hambat Minimal (KHM)	Uji mendapatkan konsentrasi terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri dalam tabung secara <i>in vitro</i>	visual	3 deret tabung dengan 7 konsentrasi ekstrak, lalu masukkan <i>S. sanguinis</i> , setelah itu semua tabung divortex, lalu masukkan ke jar <i>anaerob</i> , lalu diinkubasi 24 jam 37°C	keruh atau tidak	nominal
5.	Zona hambatan	Daerah jernih di sekeliling cakram kertas yang telah dipaparkan ekstrak etanol <i>H.sabdariffa L.</i>	calliper	jarak daerah jernih di sekeliling cakram kertas	mili-meter	numerik
6.	LD <sub>50</sub>	Uji keamanan hewan coba dengan lihat dosis lethal median (LD <sub>50</sub> ) : dosis yang dapat timbulkan kematian 50% hewan coba tikus <i>Sprague-Dawley</i>	metode Weil	menghitung LD <sub>50</sub> dan hsl uji diklasifikasikan kriteria: supertoksik ≤5mg/kg, amat sgt toksik 5-50 mg/kg, sangat toksik 50-500 mg/kg, toksik sedang 0,5-5 g/kg, toksik ringan 5-15 g/kg, tidak toksik >15 g/kg	tidak toksik atau toksik	nominal
7.	Berat badan	Berat badan tikus selama dan sesudah penelitian	visual	menimbang berat badan tikus, menggunakan timbangan hewan	gram	nominal
8.	Perilaku	Tingkah laku tikus <i>Sprague-Dawley</i> dalam waktu 30 hari guna mengetahui keamanan	visual	mengamati perubahan tingkah laku tikus	toksik atau tidak toksik	nominal
9.	Karakteristik	Hasil Pemeriksaan darah (leukosit, Hb)	Pemeriksaan hematologi	diambil darah tikus dan diperiksa lab	leukosit (x10 <sup>3</sup> mm) Hb (g/dL)	numerik
10.	Biokimia Darah	Pemeriksaan SGOT, SGPT, kreatinin, Ureum	<i>Reflotron Plus</i>	sesuai instruksi <i>Reflotron Plus</i>	IU/L	numerik
11.	Histopatologi hati dan ginjal	Pemeriksaan sediaan histopatologi hati dan ginjal	mikroskopis	Dibuat sediaan histopatologis dilihat mikroskop	ada/tidak ada kerusakan	numerik

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
12.	Uji sito-toksisitas	Uji untuk mengetahui efek toksik suatu bahan terhadap panjang gelombang tertentu	ELIZA reader panjang gelombang 490 nm	Sel dikultur lalu dipaparkan ekstrak <i>H. sabdariffa</i> L dan diuji MTT. Nilai absorbansi dibaca dengan ELIZA reader dengan panjang gelombang 490 nm	nilai absorbansi. Hitung % viabilitas sel = (nilai absorbansi perlakuan : nilai absorbansi kontrol) x 100%. Toksik jika % viabilitas < kontrol	numerik
13.	Uji efek antibakteri ekstrak etanol <i>H. sabdariffa</i> L terhadap potensi pertumbuhan <i>S. sanguis</i> dalam biofilm	Uji mengetahui efektivitas antibakteri ekstrak terhadap potensi pertumbuhan <i>S. sanguinis</i> dalam biofilm	ELIZA Reader panjang gelombang 490 nm ( <i>crystal violet</i> )	Pemaparan ekstrak terhadap <i>S. sanguinis</i> dalam biofilm, kemudian diuji dengan <i>crystal violet</i> . Perubahan bahan dibaca dengan ELIZA Reader (490nm)	nilai <i>optical density</i> . Viabilitas = (rata-rata absorbansi uji : rata-rata absorbansi kontrol) x 100%	numerik

## 4.8 Bahan, Alat dan Cara Kerja Penelitian

### 4.8.1 Tahap Penyediaan Simplisia

#### 4.8.1.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan Penelitian adalah simplisia nabati kelopak bunga *H. sabdariffa* L yang diperoleh dari Balai Tanaman Obat dan Aromaterapi (Ballitro) Bogor. Pengambilan bahan dilakukan dengan cara pemetikan kelopak bunga. Pemetikan dilakukan pada pagi hari. Usia pemetikan sekitar 4 bulan. Alat yang digunakan adalah alat penusuk atau pembuka biji, alat penggiling *Miley Willy*

#### 4.8.1.2 Identifikasi Simplisia Dilakukan Melalui Cara Organoleptik dan Cara Kimiawi

Ada dua cara identifikasi simplisia yaitu cara organoleptik dan kimiawi. Organoleptik adalah identifikasi awal dari simplisia yang dinyatakan melalui deskripsi panca indera yang meliputi bentuk, bau, warna dan rasa simplisia. Indera perasa dan penciuman dapat digunakan untuk identifikasi awal bahan aktif biologi secara sederhana, dan dapat dilakukan di lapangan, tanpa memerlukan peralatan

khusus.<sup>41</sup> Dari bentuknya, tumbuhan yang mengandung bahan bioaktif, serta dapat diidentifikasi dengan melihat bentuk atau keadaan tumbuhan apakah tumbuhan mudah diserang hama penyakit atau predator. Hama penyakit dan predator tidak akan menyerang atau memakan tumbuhan yang mengandung bahan aktif biologi yang memamatkannya, karena hama dan predator tersebut mempunyai *instinct* alami untuk menghindari hal-hal yang membahayakan dirinya.<sup>40</sup>

Indera perasa merupakan sesuatu yang sangat sensitif dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi bahan aktif biologi yang terdapat pada tumbuhan. setiap bahan aktif biologi mempunyai rasa yang khas atau spesifik<sup>40,41</sup> yaitu : rasa pahit biasanya merupakan golongan alkaloid. Rasa pahit seperti diterpenoid dan triterpenoid. Rasa menggigit, merangsang atau pedas biasanya merupakan golongan fenolik dan turunannya. Rasa manis biasanya merupakan golongan karbohidrat, terpenoid atau fenil-propanoid, flavonoid serta diterpenoid dan triterpenoid glikosida seperti pada kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Rasa kesat biasanya merupakan senyawa golongan tanin atau polifenol. Rasa asam biasanya merupakan golongan asam karboksilat rendah.

Bau atau aroma dapat digunakan untuk mengidentifikasi bahan aktif biologi, terutama yang mengandung bahan aktif berbentuk gas (*volatile*) atau minyak atsiri dan resin. Bahan aktif biologi ini banyak dijumpai pada *family Berberidaceae, Ericaceae, Esteraceae, Fabaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Moraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Poaceae, Rosaceae, Rutaceae dan Lamiaceae*. Bahan-bahan aktif biologi yang dapat menimbulkan aroma tersebut pada umumnya adalah senyawa-senyawa golongan alkohol, keton dan *aldehida* dari *monoterpen* dan *seskuioterpen* serta *fenilpropanoid*.<sup>41</sup>

Cara untuk identifikasi bahan alam yang lain dapat dilakukan secara kimiawi langsung pada simplisia. Metode identifikasi dapat dilakukan berdasarkan pada metode penapisan fitokimia (*Phytochemical screening*) terhadap golongan senyawa kimia tertentu seperti alkaloid, saponin, steroid, glikosida, flavonoid, antrakuinon, kumarin, tanin dan polifenol dengan menggunakan pereaksi warna.<sup>41,57</sup>

## 4.8.2 Tahap Ekstraksi

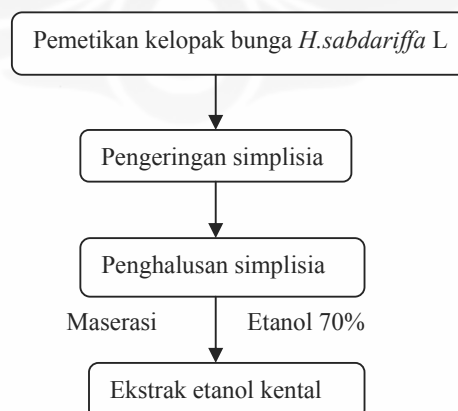
### 4.8.2.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan ekstrak adalah simplisia kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang sudah dikeringkan dan dihaluskan serta etanol 70%. Alat yang digunakan adalah alat penggiling daun, corong pisah, maserator, *rotary evaporator*, *waterbath*, alat penyaring kelopak, dan botol berwarna coklat.

### 4.8.2.2 Cara kerja

Cara Kerja pembuatan ekstrak etanol dimulai dari pengeringan simplisia dan dilanjutkan dengan pembuatan ekstrak etanol. Pada pengeringan simplisia : kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dipetik dari pohonnya, biji dikeluarkan dengan alat khusus, lalu kelopak ditimbang. Kelopak bunga dikeringkan di udara terbuka dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar selama 14-21 hari, hingga konsistensi kering, seperti keripik, kemudian berat simplisia kering ditimbang (2152 gram)

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi menggunakan etanol 70%. Secara ringkas proses ekstraksi dilakukan sebagai berikut : simplisia kering dihaluskan (2096 gram). Sebanyak 1/3 bagian dimasukkan ke dalam maserator, kemudian ditambahkan dengan 2/3 bagian cairan etanol. Bejana ditutup dan dibiarkan selama 3 hari dengan kondisi terlindung cahaya matahari, sambil sekali-kali diaduk. Setelah itu simplisia disaring, diperas. Hasil maserasi disuling atau diuapkan pada tekanan rendah menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu tidak lebih dari 50 °C, sehingga terbentuk suatu ekstrak kental (545,5 gram).<sup>111</sup> Adapun cara penyiapan ekstrak dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2. Alur Cara Penyiapan Ekstrak<sup>41,120</sup>

### 4.8.3 Analisis Fitokimia Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

#### 4.8.3.1 Bahan dan Alat Penelitian

Bahan penelitian adalah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Bahan penunjang untuk identifikasi fitokimia secara kualitatif dan semi kualitatif : kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ), amonia ( $\text{NH}_3$ ), asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), asam asetat anhidrat ( $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ), asam klorida ( $\text{HCl}$ ) 2N, amonium hidroksida ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), pereaksi *Mayer*, pereaksi *Dragendorff*, pereaksi *Hager*, Pereaksi *Wagner*, *Ferric chloride* ( $\text{FeCl}_3$ ), logam Mg, etanol, etil alkohol, asam pikrat, Sodium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), natrium klorida, buah lerak, kulit jeruk, buah pinang, daun pegagan, bunga cengkeh kering, dan daun digitalis.

Alat-alat yang digunakan tabung pereaksi, botol pereaksi, botol coklat, pipet, timbangan elektrik, cawan porselen, kertas saring, tanur, oven

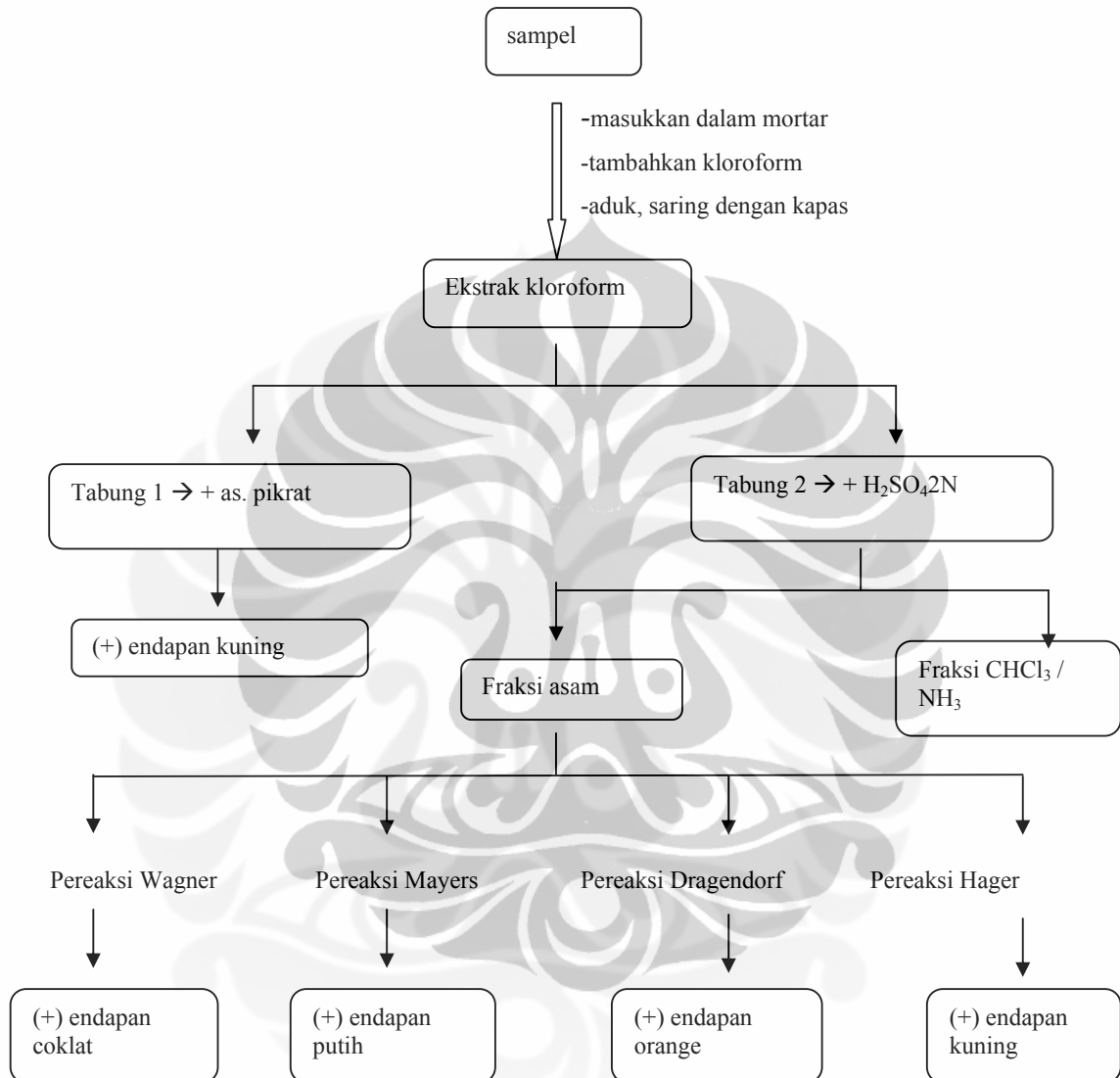
#### 4.8.3.2 Identifikasi Kandungan kimia kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Identifikasi kandungan kimia simplisia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terdapat di dalam simplisia kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Identifikasi dilakukan baik secara kualitatif maupun kuantitatif, dengan cara-cara sebagai berikut : pengujian golongan alkaloid, saponin, steroid dan terpenoid, tanin dan flavonoid.<sup>41,112</sup>

**Pemeriksaan Alkaloid.** Sebanyak 2-4 gr simplisia dipotong-potong, dimasukkan ke dalam *mortar* dan ditambahkan kloroform secukupnya lalu digerus dengan kuat. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring, kemudian kedalamnya ditambahkan asam klorida 2N. Campuran dikocok dengan kuat hingga terdapat dua lapisan. Lapisan atas diambil dengan pipet, kemudian dibagi menjadi tiga bagian. Bagian pertama digunakan blangko, bagian kedua ditetesi dengan pereaksi *Mayer*, kemudian diamati ada atau tidaknya endapan atau keruhan berwarna putih yang menandakan simplisia terkandung alkaloid. Bagian ketiga ditetesi dengan larutan pereaksi *dragendorff*, kemudian diamati ada atau tidaknya endapan berwarna orange atau jingga yang menunjukkan bahwa dalam simplisia terkandung alkaloid, dengan kriteria : sedikit keruh (+), sangat keruh (++) , dan terjadi endapan (+++). Apabila tidak berhasil, dapat juga digunakan pereaksi *wagner*, dimana akan terbentuk endapan coklat.<sup>41,112</sup>



Bagan alur pemeriksaan Alkaloid sebagai berikut (gambar 4.3) :



Gambar 4.3. Bagan Alur Pemeriksaan Alkaloid<sup>41,112</sup>

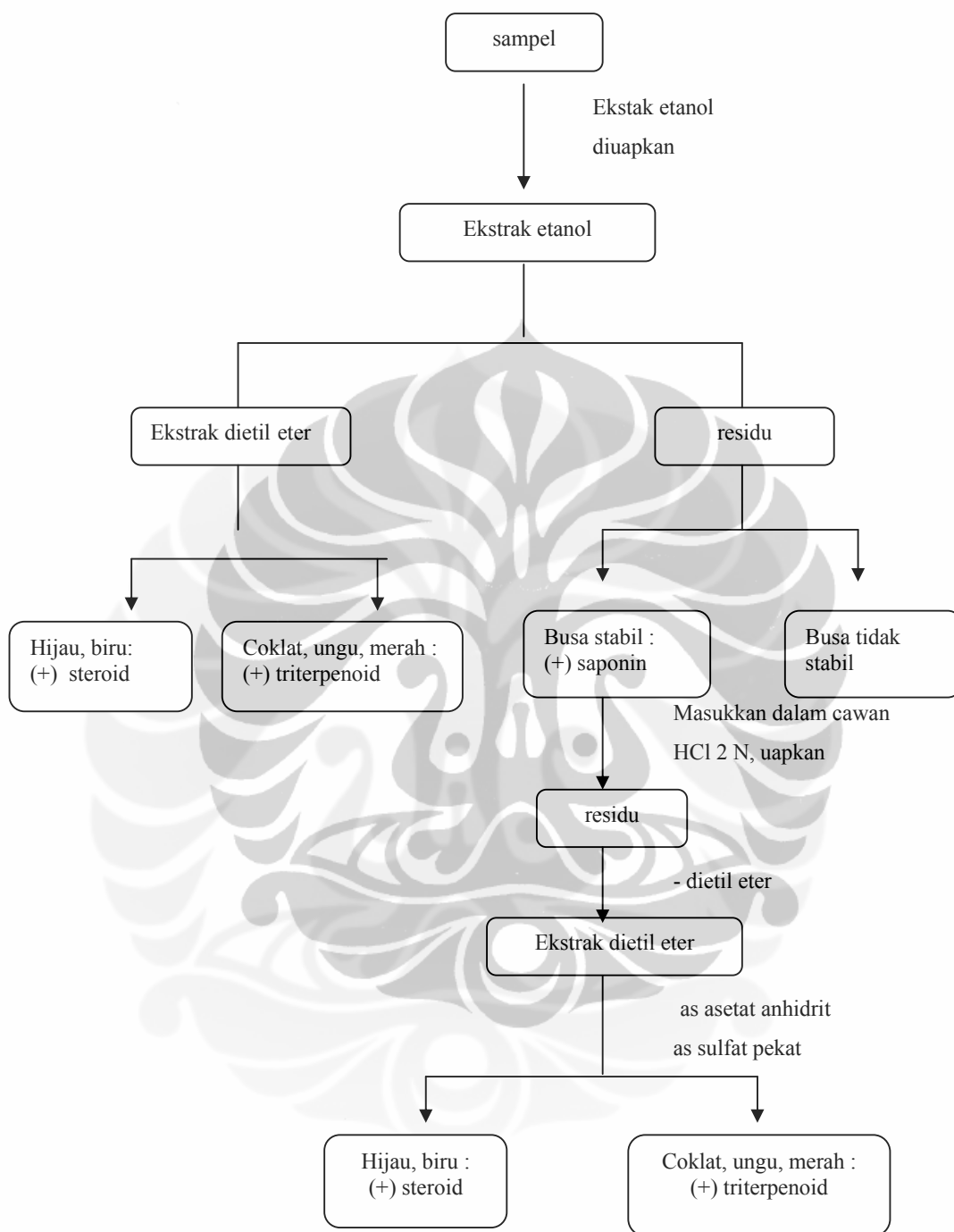
**Pemeriksaan Saponin.** Simplisia dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan air, lalu dipanaskan beberapa saat, kemudian disaring. Setelah dingin filtrat dalam tabung reaksi dikocok kuat-kuat selama lebih kurang 30 detik. Pembentukan busa sekurang-kurangnya 1 cm tinggi dan persisten selama beberapa menit serta tidak hilang pada penambahan 1 tetes asam klorida encer menunjukkan bahwa dalam simplisia terdapat saponin. Selanjutnya residu diekstrak dengan dietil

eter. Tambahkan asam asetat anhidrit dan asam sulfat pekat. Kemudian amati, jika terbentuk warna hijau, biru maka simplisia + (positif) mengandung steroid, dan jika warna yang terbentuk coklat, ungu dan merah berarti simplisia + (positif) mengandung triterpenoid.<sup>41, 112, 116</sup>

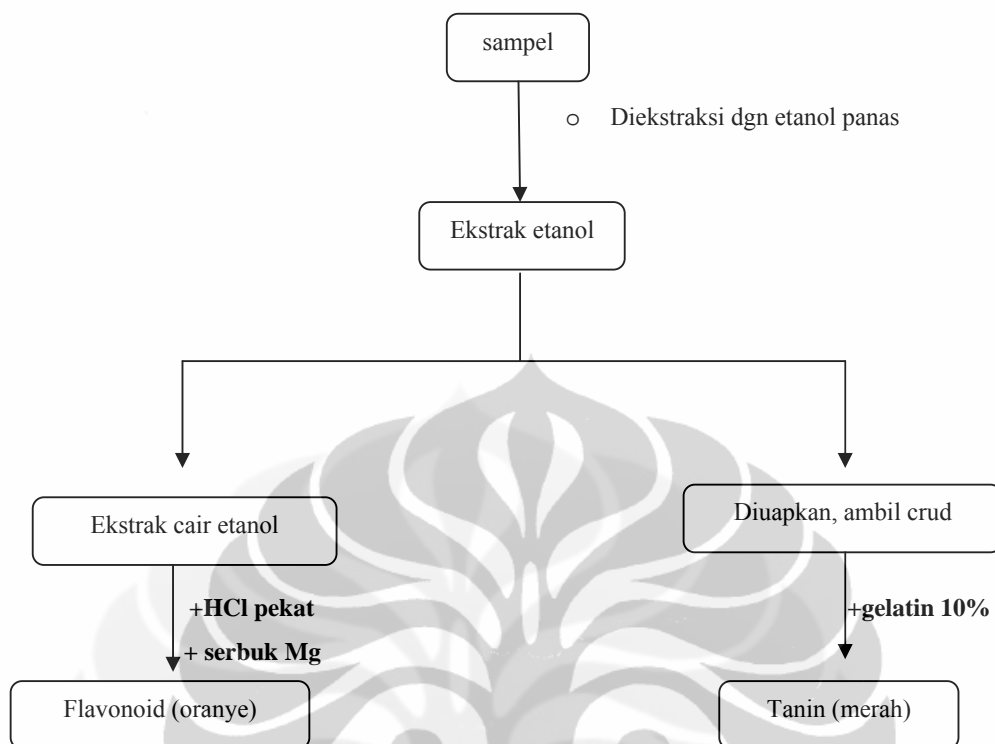
**Pemeriksaan Steroid dan Triterpenoid.** Ekstrak etanol diuapkan dan ditambahkan dietileter, kemudian sari eter diuapkan hingga kering. Pada residu terlihat bila busa stabil maka mengandung saponin. Selanjutnya residu diteteskan HCl 2N dan diuapkan, sehingga terbentuk ekstrak dietil eter. Terbentuknya warna ungu atau coklat menunjukkan bahwa dalam simplisia terkandung senyawa kelompok terpenoid, sedangkan bila terbentuk warna hijau-biru menunjukkan adanya kelompok steroid. Bagan alur pemeriksaan Saponin, Steroid dan Triterpenoid terlihat seperti di bawah ini (gambar 4.4).<sup>41, 112, 114, 116</sup>

**Pemeriksaan Tanin.** Simplisia diekstraksi dengan etanol panas, selanjutnya dipanaskan dengan air diatas tangas air, kemudian disaring panas-panas. Sebagian kecil filtrat diuji ulang dengan penambahan larutan gelatin 10%. Terbentuknya warna merah menunjukkan bahwa simplisia terdapat tanin.<sup>41, 112, 117</sup>

**Pemeriksaan Flavonoid.** Simplisia diekstraksi dengan etanol panas, selanjutnya dipanaskan dengan campuran bubuk magnesium dan asam klorida 5N. Adanya flavonoid akan menyebabkan filtrat berwarna oranye, yang dapat ditarik oleh etanol. Untuk mempermudah pengamatan, sebaiknya dilakukan percobaan blangko.<sup>41, 112</sup> Bagan alur pemeriksaan Tanin dan Flavonoid terlihat pada gambar 4.5.



Gambar 4.4. Bagan Alur Pemeriksaan Saponin, Steroid, Triterpenoid.<sup>41,112</sup>



Gambar 4.5. Bagan Alur Pemeriksaan Flavonoid dan Tanin.<sup>41,112</sup>

#### 4.8.4 Uji Parameter Standar Ekstrak

##### 4.8.4.1 Pemeriksaan Parameter Non Spesifik

Pemeriksaan Parameter non spesifik meliputi susut pengeringan, bobot jenis, kadar air dan kadar abu. Cara pengukuran susut pengeringan yaitu ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1-2 gram lalu dimasukkan ke dalam cawan penguap yang telah ditara. Sebelum ditara, cawan dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit. Ekstrak diratakan di dalam cawan penguap dengan bantuan batang pengaduk kemudian dimasukkan ke dalam oven pengering. Ekstrak dikeringkan pada suhu 105°C sampai didapatkan bobot yang konstan.<sup>38,110</sup>

Cara penentuan bobot jenis yaitu dengan menyiapkan alat piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi ditetapkan bobotnya dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C. Ekstrak cair dengan suhu 20°C dimasukkan dalam piknometer. Kelebihan ekstrak cair dibuang, kemudian piknometer ditimbang. Bobot ekstrak cair

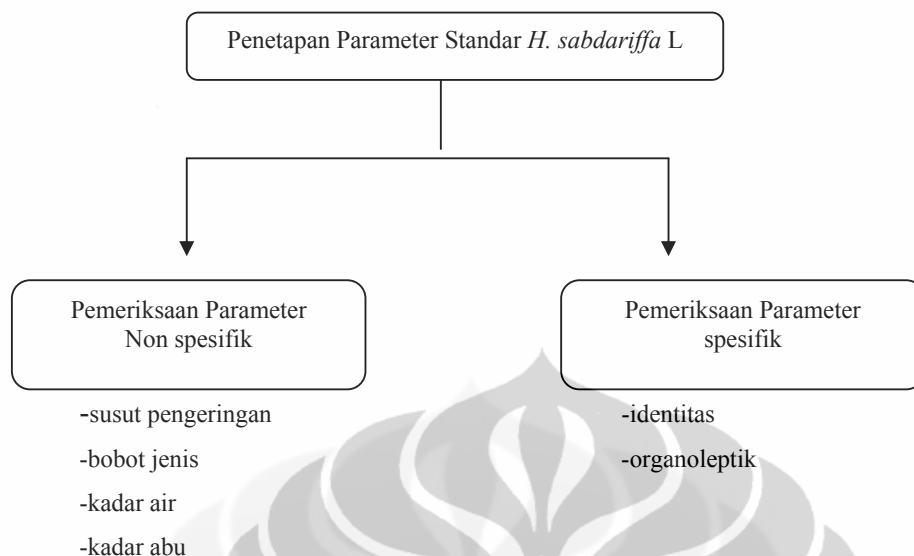
didapat dengan mengurangi bobot piknometer yang telah diisi terhadap bobot piknometer kosong. Bobot jenis ekstrak adalah bobot ekstrak yang dibagi oleh bobot air.<sup>38,110</sup>

Penentuan kadar air dengan cara menimbang ekstrak secara seksama sebanyak 10 gr, lalu dimasukkan ke dalam labu. ditambahkan 200 mL *toluene* yang telah diredistilasi ke dalam labu. labu dipanaskan selama 15 menit. setelah toluen mendidih, disuling dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detiknya. Setelah semua air tersuling, tabung penerima didinginkan hingga suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dalam tabung penerima dapat dibaca dan dihitung persentase kadarnya.<sup>38,110</sup>

Cara menentukan kadar abu yaitu penggunaan 1 gram simplisia dihaluskan dan ditimbang dengan seksama. Serbuk ditempatkan di dalam cawan porselen kemudian dipanaskan di dalam tanur pada suhu 600°C selama 24 jam. Setelah itu ekstrak dimasukkan kedalam desikator supaya bahan tetap stabil dan tidak menyerap air, kemudian didinginkan selama 24 jam, lalu ditimbang. Selain itu dilakukan penetapan nilai rendemen dan nilai *drugs equivalent ratio* (DER). Rendemen adalah persentase berat ekstrak dibagi dengan berat simplisia awal. *Drugs equivalent ratio* (DER) adalah rasio atau perbandingan antara berat simplisia awal dengan berat ekstrak yang diperoleh.<sup>38,110</sup>

#### **4.8.4.2 Pemeriksaan Parameter Spesifik**

Pada pemeriksaan parameter spesifik dilakukan pemeriksaan identitas dan organoleptik. Pada penentuan identitas dilakukan deskripsi tanaman, terdiri dari nama ekstrak, nama latin dan nama indonesia (nama lokal) tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan dan senyawa identitas tumbuhan. Pada penentuan organoleptik digunakan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau dan rasa ekstrak.<sup>38</sup> Alur kerja penetapan parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terlihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6. Bagan Penetapan Parameter Standar Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.<sup>38,110</sup>

#### 4.8.5 Tes Sensitivitas dengan Metode Dilusi (*Dilution Test*) dan Metode Difusi (*Difusion Test*)

Tes sensitivitas bakteri dapat dilakukan dengan 2 metode yaitu metode dilusi (*dilution method*) dan metode difusi (*disc with drug in solid media method*).<sup>122,123</sup> Tes sensitivitas metode dilusi digunakan untuk menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis*, sedangkan metode difusi untuk menentukan zona hambat.

Uji kadar hambat minimal (KHM) adalah uji untuk mengetahui konsentrasi antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang masih efektif untuk mencegah pertumbuhan *S. sanguinis* dan mengindikasikan dosis yang efektif dalam mengontrol infeksi. Metode dilusi kemudian dilanjutkan dengan pembiakan ulang atau subkultur pada media agar darah guna menentukan nilai kadar bunuh minimal (KBM), yaitu konsentrasi yang efektif suatu bahan uji dimana tidak terdapat *S. sanguinis* yang masih hidup.<sup>122,123</sup>

#### 4.8.5.1 Bahan dan Alat Penelitian

Subyek penelitian : *S. sanguinis* galur ATCC 10556. Bahan utama yaitu ekstrak kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam ekstrak etanol dalam 7 konsentrasi yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%. Bahan penunjang adalah : *Thioglycollate broth* dan *Brain Heart Agar*, klorheksidin glukonat 0,1% dan 0,2% (Klh), *Gas Generating Kit*, kapas, DMSO (*dimethyl sulfoxide*) sebagai bahan pelarut.

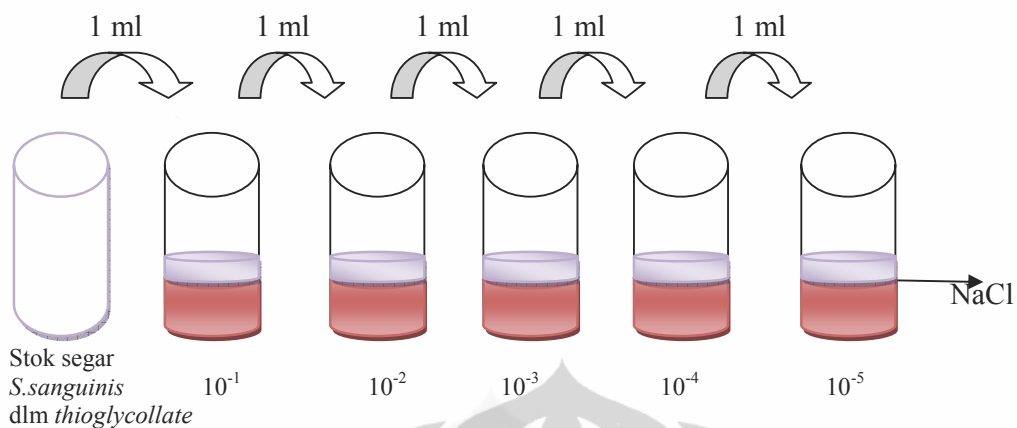
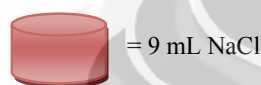
Alat alat yang digunakan adalah tabung reaksi (10 ml), rak tabung, pipet dan tip, gelas ukur, sengkeli, *vortexer*, inkubator, jar anaerobik, lemari pendingin, cawan petri, lemari kerja steril.

#### 4.8.5.2 Cara kerja

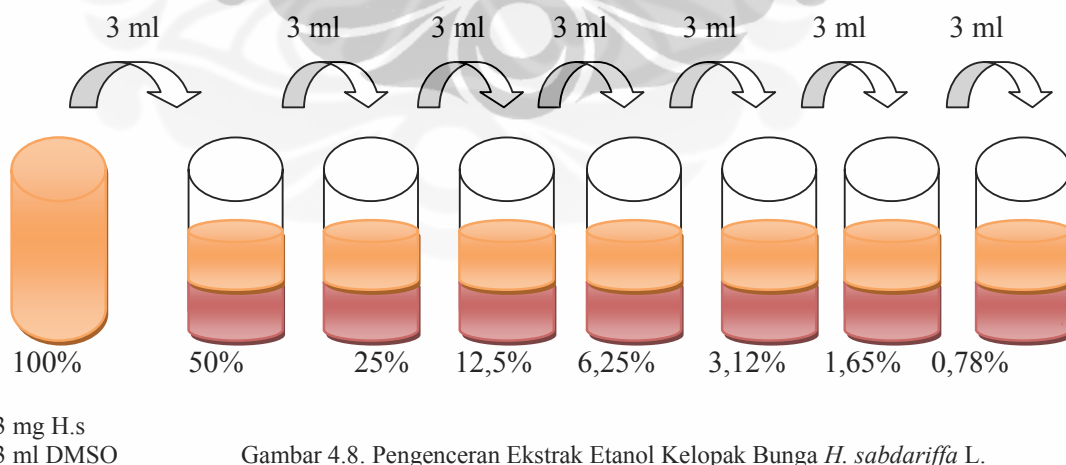
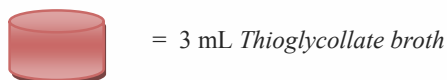
Persiapan alat seperti tabung reaksi, mikropipet, tip pipet disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 20 menit. Persiapan media perbenihan *S. sanguinis* yang digunakan adalah *thyoglycollate broth* dengan mencampurkan 25 gram *thyoglycollate* bubuk dalam 1 liter aquadest steril lalu di *vortex* selama 3 menit dan diinkubasi selama 2 jam, ditunggu sampai dingin. Selain itu disiapkan *Thyoglycollate* agar.

Dilakukan perbenihan segar *S. sanguinis* dalam *thyoglycollate* agar yang disimpan dalam inkubator 37°C selama 48 jam. Setelah itu semua biakan *S. sanguinis* dikerok dan dimasukkan dalam tabung *effendorf* yang berisi 0,3 mL NaCl dan diaduk dengan pipet. Lalu hasilnya dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 10 mL *thyoglycollate broth* lalu diinkubasi dalam inkubator pada kondisi 37°C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pengenceran sampai  $10^{-5}$ .

Pengenceran bakteri *S. sanguinis*. Pertama tabung berisi larutan induk *S. sanguinis* dikeluarkan dari inkubator. Disiapkan 6 tabung reaksi. Kemudian 1 mL dari tabung stok (tabung 1) dipindahkan ke tabung 2 yang sudah berisi 9 mL NaCl (pengenceran  $10^{-1}$ ), lalu 1 mL dari tabung ke-2 dipindahkan ke tabung 3 yang telah berisi 9 mL NaCl (pengenceran  $10^{-2}$ ) dan seterusnya sampai pengenceran  $10^{-5}$ . Lalu semua tabung tersebut dimasukkan dalam anaerobik jar dan diinkubasi dalam inkubator pada kondisi 37°C selama 30 menit (Gambar 4.7)

Gambar 4.7 Pengenceran *S. sanguinis*

Selanjutnya dilakukan pembuatan berbagai konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Disiapkan 8 tabung reaksi. Pada tabung 1 dibuat stok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan mencampurkan 3 mL ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan 3 mL DMSO 1% (konsentrasi 100%), Selanjutnya ambil 3 mL dari tabung 1 dituang ke tabung ke 2 yang telah diisi dengan 3 mL thioglycollate (konsentrasi 50%), demikian seterusnya sampai konsentrasi 0,78% seperti terlihat pada gambar 4.8.

Gambar 4.8. Pengenceran Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

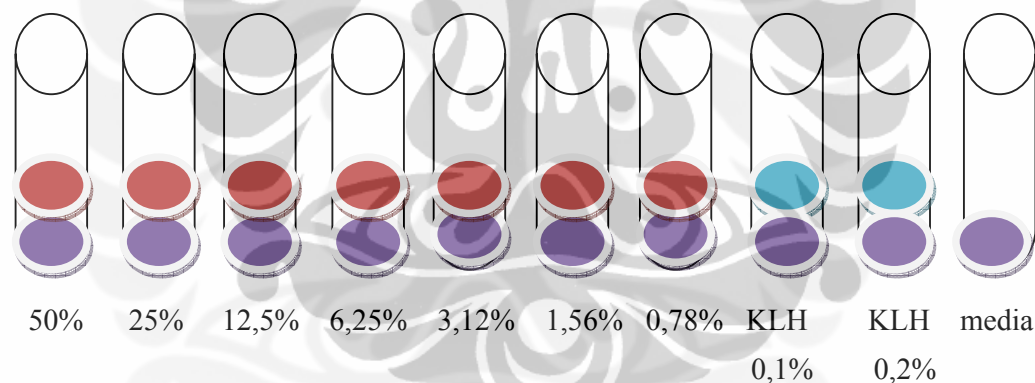


Pengenceran ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dibuat *triplo*. Selanjutnya dilakukan pemaparan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* untuk menentukan KHM dan KBM dengan metode dilusi dan penentuan zona hambat dengan metode difusi.

## A. Penentuan KHM dan KBM dengan metode dilusi

### A.1 Pemaparan pada *thyoglycollate broth*.

Disiapkan 10 tabung reaksi yang masing-masing diisi 1 mL *S. sanguinis*  $6 \times 10^5$ , lalu tabung 1-7 ditambahkan 1 mL ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berbagai konsentrasi. Pada tabung ke-8 dan 9 diisi 1 mL klorheksidin 0,1% dan 0,2% (kontrol positif). Pada tabung ke-10 diisi 1 mL *thyoglycollate* (kontrol negatif). Percobaan ini dilakukan secara *triplo*. Kemudian semua tabung dimasukkan dalam *anaerobic jar* dan diinkubasi dalam inkubator pada kondisi 37°C selama 48 jam.



Gambar 4.9. Uji KHM Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L. Terhadap *S. Sanguinis*

Keterangan :

- Tabung 1 s/d 10 (ungu) = 1 ml *S.sanguinis*  $6 \times 10^5$
- Tabung 1 s/d 7 (merah) = 1 ml ekstrak kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berbagai konsentrasi
- Tabung 8-9 (biru muda) = 1 ml klorheksidin 0,1 % dan 0,2% (kontrol positif)
- Tabung 10 (ungu) = biakan *S.sanguinis* (kontrol negatif)

Setelah 24 jam, dilihat derajat kekeruhannya dengan penerangan yang cukup untuk melihat konsentrasi ekstrak kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Jika larutan tampak jernih berarti tidak ada

pertumbuhan bakteri artinya mikroba sensitif terhadap ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Kekeruhan yang tampak pada medium *thyoglycollate* mengindikasikan adanya pertumbuhan mikroba. Bila terdapat pertumbuhan (+) dan tidak ada pertumbuhan (-).

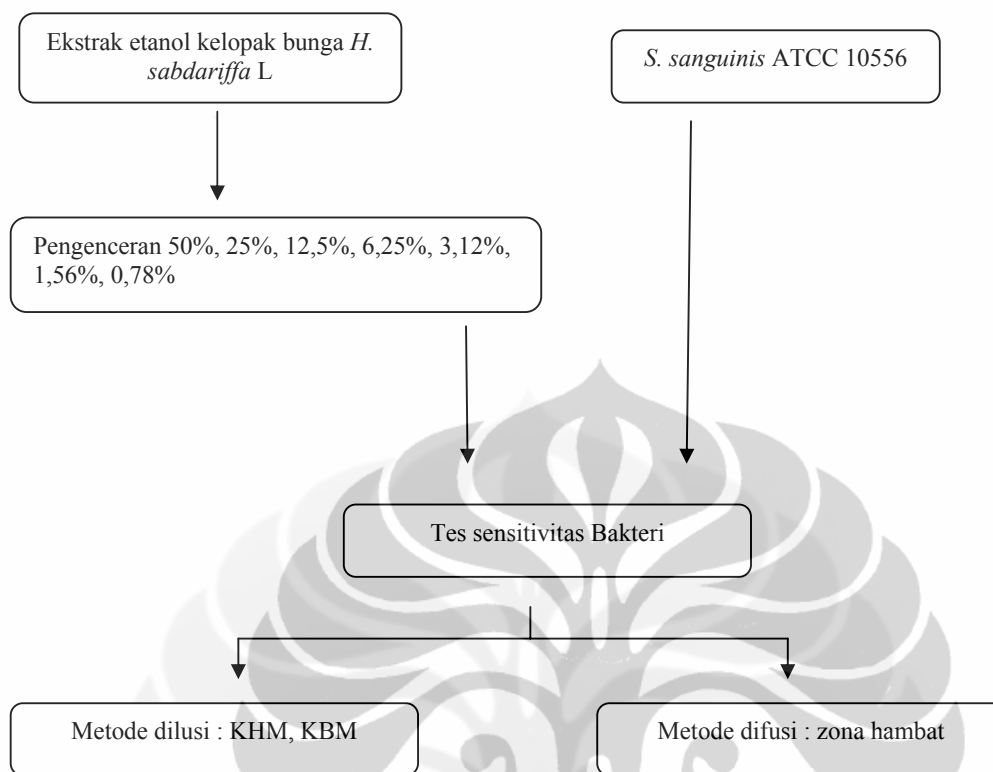
## **A.2 Pemaparan pada *Thyoglycollate* agar**

Di atas media *thyoglycollate* agar disebar sebanyak 1 mL *S. sanguinis* dengan konsentrasi  $6.10^5$  /mL lalu ditunggu sampai kering. Kemudian diteteskan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berbagai konsentrasi masing masing 10 $\mu$ L. Pada kontrol positif, dimasukkan klorheksidin 0,1% dan 0,2%, lalu diinkubasi dalam suasana anaerob selama 24 jam pada suhu 37°C. Untuk melihat KBM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* dengan melihat pada plat agar ada tidaknya koloni bakteri yang timbul pada permukaan medium agar *thyoglycollate*. Catat hasil dengan menilai adanya bakteri (+) dan tidak ada bakteri (-).<sup>30</sup>

## **B. Penentuan zona hambatan dengan metode difusi.**

Pada media *thyoglycollate* agar yang telah dipersiapkan ditanam 1 mL bakteri *S. sanguinis* konsentrasi  $6.10^2$ . Selanjutnya *blank disk* diletakkan di atas *thyoglycollate* agar, dan 10  $\mu$ L ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,65%, 0,78% diteteskan di atas *blank disc*. Kemudian media agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekitar spesimen kemudian diukur dengan jangka sorong (*calliper*).

Adapun alur kerja uji sensitivitas dapat dilihat pada gambar 4.10. di bawah ini



Gambar 4.10. Alur Kerja Tes Sensitivitas

#### 4.8.6 Uji Toksisitas Akut pada tikus *Sprague-Dawley*

##### 4.8.6.1 Bahan dan Alat Penelitian

Subyek penelitian adalah tikus *Sprague-Dawley*, jantan umur 3 bulan, berat badan 150-170 g. Bahan uji : ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dan bahan pelarut *carboxy methyl cellulose* (CMC) 1 %. Bahan penunjang adalah makanan dan minuman tikus.

Alat yang digunakan adalah kandang tikus, peralatan konsumsi tikus, gelas ukur, timbangan badan tikus (*Ohaus*), peralatan laboratorium untuk uji toksisitas akut, botol vial, gelas ukur, syringe 1 ml, sonde oral untuk tikus, timbangan analitik.

#### 4.8.6.2 Aklimisasi

Sebelum pelaksanaan pengujian, tikus diaklimisasi lebih dulu di dalam ruangan percobaan selama tujuh hari. Aklimisasi adalah penempatan semua hewan coba di dalam satu ruangan dengan kondisi yang sama. Kondisi ruangan serta teknik pemeliharaan hewan harus diawasi secara ketat, agar diperoleh hasil yang baik. Digunakan ruangan hewan konvensional atau ruangan lain yang memenuhi persyaratan. Suhu, kelembaban, cahaya dan kebisingan harus sesuai dengan kebutuhan hidup hewan uji, serta ruangan harus selalu dijaga kebersihannya.<sup>132,133</sup>

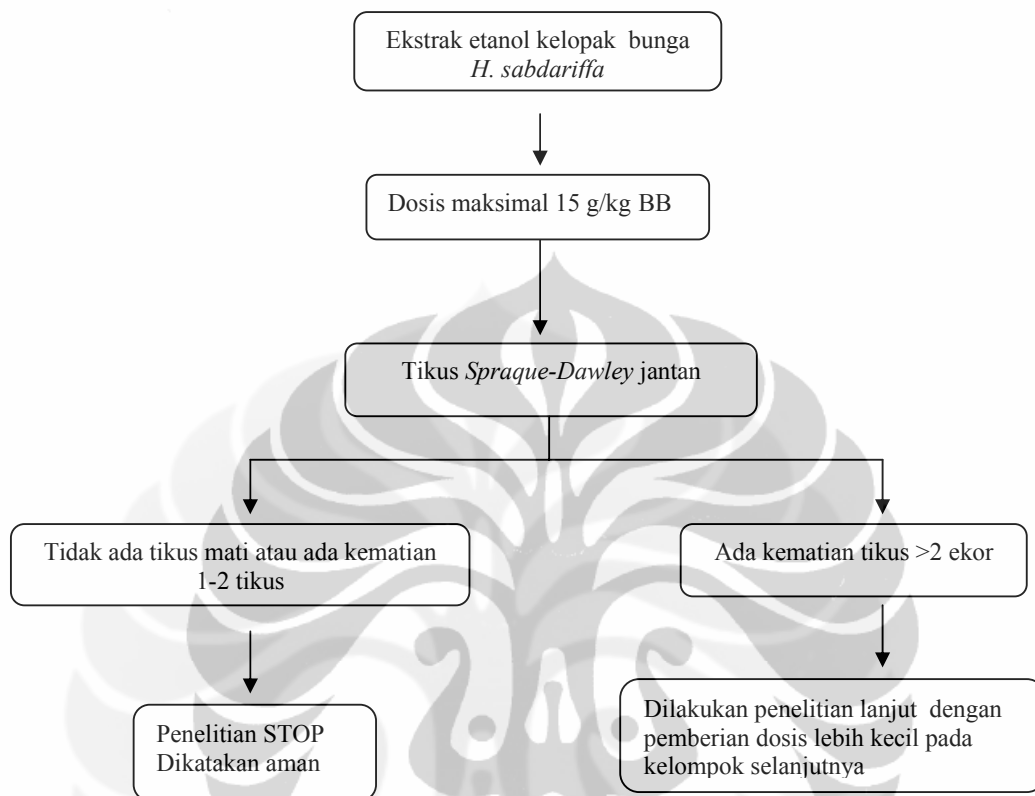
Kondisi yang dianjurkan adalah suhu ruangan  $22^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ})$ , kelembaban relatif 30-70%, dengan kondisi ruangan yang terang selama 12 jam dan gelap selama 12 jam. Hewan dikelompokkan dalam kandang berdasarkan jenis kelamin. Ukuran kandang yang digunakan sesuai dengan jumlah hewan tiap kandang. Hewan diberi makanan hewan laboratorium yang sesuai, dan pemberian makanan dan minuman tidak dibatasi. Tikus dipuasakan selama 17-20 jam sebelum dilakukan pengujian dengan tetap diberi minum.<sup>132,133</sup>

#### 4.8.6.3 Cara kerja

Uji toksisitas akut dimulai dari dosis terbesar yaitu 15 g/kgBB, kemudian setelah diberikan cekok dosis tunggal, dilihat pada hari ke-14 apakah ada tikus yang mati atau tidak. Mula-mula disiapkan 5 ekor tikus jantan atau betina. Pengujian dilakukan dengan pencekokan sebanyak 15 g/kgBB, dimasukkan dalam rongga mulut menggunakan alat pencekok atau sonde lambung. Pada hari ke-14 setelah pencekokan tunggal, diperiksa apakah ada yang mati atau tidak. Bilamana pada akhir uji ternyata tidak ada yang mati atau kematian sampai dua tikus maka uji dihentikan dan dinyatakan aman. Jika ada kematian lebih dari 2 ekor tikus maka uji dilanjutkan pada kelompok ke-2 dimana dosis sudah diturunkan.

Selanjutnya dilakukan pengamatan pada tikus. Pengamatan pada tikus dilakukan pada 1 jam, 2 jam, dan 4 jam kemudian dilanjutkan setiap hari sampai hari ke-14. Pada hari terakhir pengamatan, semua hewan coba didekapitasi dan dilakukan pemeriksaan makroskopis semua organ dalam, bilamana ditemukan kelainan dicatat dan dilakukan pemeriksaan mikroskopis.

Adapun alur Proses Uji Toksisitas Akut dapat dilihat pada gambar 4.11.



Gambar 4.11. Alur Proses Uji Toksisitas Akut

#### 4.8.7 Uji Toksisitas Subkronis

##### 4.8.7.1 Bahan dan Alat Penelitian

Subyek penelitian adalah 40 ekor tikus *Spraque-Dawley* jantan dan betina, umur 2 -3 bulan, berat badan 150-170 g (Tikus diperoleh dari Balai POM Jakarta). Bahan uji : ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dan bahan pelarut *carboxy methyl cellulose (CMC)* 1 %. Bahan penunjang adalah Aquades, eter, serial larutan alkohol 60%, 70%, 80% dan 96% asam hidroklorida (HCl) 0.1 N, natrium sitrat 2.5%, formalin 10%, pewarna hematoksilin-eosin (HE), larutan *turk* 0.1%, fiksatif (*Bouin*), larutan xylol-alkohol (1;1) dan (1:3), larutan xylol : paraffin (1:10 dan (1:3, xylol murni, *Canada balsam*, larutan *paraffin*, larutan eosin.

Alat yang digunakan adalah alat penimbang khusus untuk hewan (*Ohaus*), cawan penguap, timbangan analitik (SNUG II – 1500), lumpang dan alu, sonde oral tikus, jarum suntik, gunting bedah, pinset bedah, *tissue*, *syringe* 2,5 ml, tabung heparin (*vacuette*), hemositometer, hemometer, mikroskop cahaya (Olympus), tabung *Sahli*, mikrotom, kaca objek, *cover glass*, pipa kapiler hematokrit, mikrosentrifugasi, sentrifugator, strip GOT, GPT (*Reflotron*), Instrumen fotometer (*Reflotron<sup>®</sup> Plus*), pipa kapiler darah 30  $\mu$ L (*Reflotron*).

#### 4.8.7.2 Cara Kerja

**Tahap aklimisasi.** Sebelum digunakan sebagai hewan coba, tikus diaklimitasi dengan lingkungan laboratorium selama 7 hari dengan diberi makan dan minum secukupnya. Hewan dikatakan sehat apabila selama masa aklimisasi bobot badannya bertambah atau tetap. Setelah aklimisasi, hewan coba dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina, diperlakukan sama seperti selama masa aklimisasi dan masing-masing kelompok terdiri jantan dan betina dimasukkan dalam kandang terpisah. Selama percobaan, tikus diberi makan dan minum secukupnya, kecuali 17-20 jam sebelum pemeriksaan, tikus dipuaskan dan diberi air minum saja.

Hewan percobaan tikus galur *Sprague-Dawley* jantan dan betina yang telah ditimbang bobot badannya, dikelompokkan dalam 4 kelompok (setiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus jantan dan 5 ekor tikus betina), antara lain : Kelompok I yaitu tikus jantan dan betina dipaparkan dosis rendah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. (1,25 g/kg BB). Kelompok II yaitu tikus jantan dan betina dipaparkan dosis menengah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. (2,5 g/kg BB). Kelompok III yaitu tikus jantan dan betina dipaparkan dosis tinggi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. (5 g/kg BB). Kelompok IV yaitu kontrol tikus jantan dan betina (diberikan 3 ml CMC). Sediaan uji diberikan secara oral sekali sehari selama 30 hari, dan dilakukan pengamatan.

**Jenis Pengamatan** Pengamatan yang dilakukan meliputi : perilaku, perubahan berat badan, pemeriksaan karakteristik darah dan kimia darah ( hemoglobin, leukosit), SGOT, SGPT, kreatinin dan ureum.

**Perilaku tikus** diamati secara kasat mata pada hari pertama dan terakhir pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. meliputi : pengamatan rasa ingin tahu (jengukan pada *platform*), aktivitas motorik, reflek pineal (reflex telinga), reflek kornea (reflex mata), lakrimasi (pengeluaran air mata), fleksi (refleks kaki), *hafner* (reflex ekor), mortalitas (kematian), *grooming*, defekasi (pengeluaran feses), urinasi (pengeluaran urin), pernafasan, salivasi, tremor (gemetar), kejang (konvulsi), dan *writhing* (menggeliat), bulu berwarna kekuningan atau kecoklatan.

**Perubahan berat badan.** Berat badan tikus ditimbang setiap hari, dari hari pertama pengujian sampai hari ke-30 dengan menggunakan timbangan khusus hewan (*Ohaus*<sup>®</sup>)

**Pemeriksaan Karakteristik dan Kimia Darah.** Pada hari ke-30, semua tikus didekapitasi, dan dilakukan pemeriksaan karakteristik darah. Dilakukan pemeriksaan kadar hemoglobin, leukosit, SGOT, SGPT, kreatinin dan ureum.

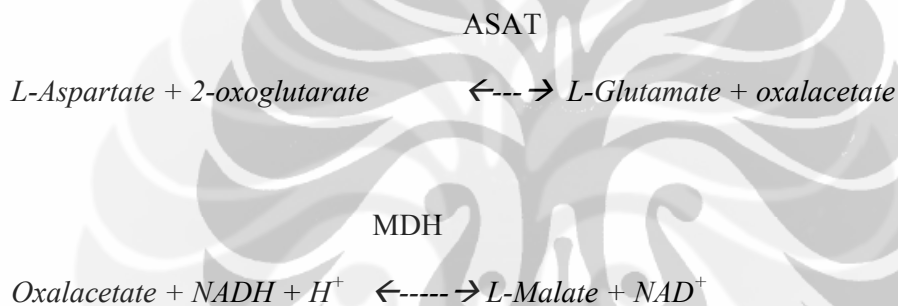
**Pengamatan kadar hemoglobin.** Kadar hemoglobin dihitung dengan menggunakan metode *Sahli*. Asam klorida 0.1 N dimasukkan ke dalam tabung *Sahli* setinggi 10% dari skala tabung (skala 2.2 g/dL). 20 $\mu$ L darah dimasukkan dengan menggunakan pipet, diaduk sehingga homogen dan diencerkan dengan HCl 0.1N hingga warna campuran sama dengan warna standar (tabung di sebelah kiri dan kanan tabung *Sahli*). Setelah warnanya sama, jumlah hemoglobin dibaca pada tabung (g/dL). Jumlah hemoglobin pada tikus normal 11,5 – 16,5 g/dL.

**Perhitungan jumlah leukosit.** Jumlah leukosit dihitung menggunakan alat hemositometer. Darah segar dipipet hingga tanda 0.5 (pada pipet), diencerkan 20x dengan aquades 100mL), dikocok hingga homogen, diteteskan di atas kaca obyek hemositometer (dua tetes), ditutup dengan *cover glass*, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Leukosit dihitung pada empat kotak kecil (empat kotak di tiap sudut) pada kotak besar yang terdapat di pusat kotak, hasilnya dikalikan dengan faktor konversi 50. Satuan hasil akhir leukosit adalah per mm<sup>3</sup>.

**Pemeriksaan Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase (SGOT).** *Aspartate Aminotransferase* (ASAT/AST), yang sebelumnya disebut sebagai *Glutamic Oxalacetic Transaminase* (GOT) merupakan enzim paling penting dalam group enzim aminotransferase yang mengkatalisis konversi dari  $\alpha$ -*keto acids* menjadi

asam amino yang ditransfer oleh group amino. Peningkatan level ASAT dapat terjadi pada kerusakan hati atau otot skeletal. Pemeriksaan paralel ALAT dan ASAT digunakan untuk membedakan kelainan hati dari kerusakan jantung atau otot skeletal. Rasio ASAT / ALAT digunakan untuk diferensial diagnosis dari penyakit hati. Bilamana ratio < 1 mengindikasikan kerusakan hati ringan, bila ratio > 1 mengindikasikan kerusakan hati berat, sering berhubungan dengan kerusakan hati kronis.

Metode dilakukan dengan *optimized UV-test* menurut IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*). Adapun prinsip kerja dari ASAT adalah :



Komponen reagen yang digunakan ada 2 macam yaitu : 1). Reagen 1 terdiri dari TRIS pH 7,65 110 mmol/L, L-Aspartate 320 mmol/L, MDH (*Malate dehydrogenase*)  $\geq 800$  U/L, LDH (*lactate dehydrogenase*)  $\geq 1200$  U/L; 2). Reagen 2 terdiri dari 2-oxoglutarate 65 mmol/L dan NADH 1 mmol/L.

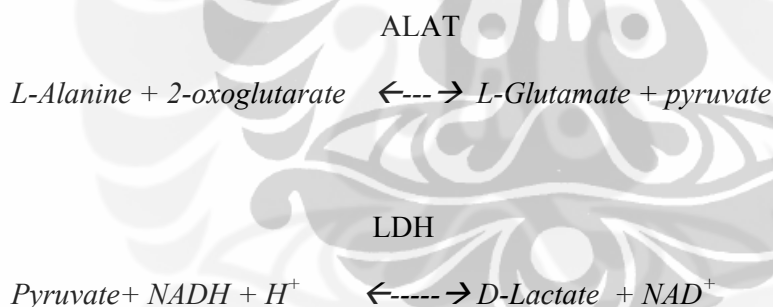
Pada tahap awal dibuat *monoreagen* terdiri dari 4 bagian R1 dan 1 bagian R2. *Monoreagaent* yang pada pembuatannya diproteksi dari cahaya. Stabilitas dapat bertahan 5 hari pada suhu 15-25°C.

Prosedur *assay* dilakukan dengan mencampurkan 100  $\mu\text{L}$  sampel dan 1000  $\mu\text{L}$ , Kemudian dibaca absorbansi setelah 1 menit, 2 menit dan 3 menit. Pembacaan absorbansi dengan menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 340nm, 365 nm, 334 nm, optical path 1 cm, temperatur 37°C, pengukuran dibandingkan dengan udara.



**Pemeriksaan Serum Glutamic Pyruvic Transaminase (SGPT).** *Alanine Aminotransferase* (ALAT/ALT), yang sebelumnya disebut sebagai *Glutamic Pyruvic Transaminase* (GPT) merupakan enzim paling penting dalam group enzim, aminotransferase atau transaminase yang mengkatalisis perubahan dari *α-keto acids* menjadi asam amino yang dilakukan oleh group amino. Seperti enzim spesifik hati, ALAT merupakan satu-satunya yang meningkat secara bermakna pada penyakit *hepatobiliary*. Peningkatan level ASAT dapat terjadi berhubungan dengan kerusakan hati atau otot skeletal. Pemeriksaan paralel ALAT dan ASAT digunakan untuk membedakan hati dari kerusakan jantung atau otot skeletal. Rasio ASAT / ALAT digunakan untuk diferensial diagnosis dari penyakit hati. Bilamana ratio < 1 mengindikasikan kerusakan hati ringan, bila ratio > 1 mengindikasikan kerusakan hati berat, sering berhubungan dengan kerusakan hati kronis.

Metode dengan *optimized UV-test* menurut IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*). Adapun prinsip kerja dari ALAT adalah :



Komponen reagen yang digunakan ada 2 macam yaitu : 1). Reagen 1 terdiri dari *TRIS* pH 7,15 140 mmol/L, *L-Alanine* 700 mmol/L, LDH (*Lactate dehydrogenase*)  $\geq 2300$  U/L; 2). Reagen 2 terdiri dari *2-oxoglutarate* 85 mmol/L dan *NADH* 1 mmol/L.

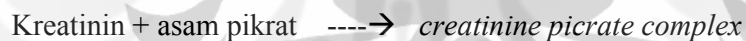
Pada tahap awal dibuat *monoreagen* terdiri dari 4 bagian R1 dan 1 bagian R2. *Monoreagen* yang dibuat diproteksi dari cahaya. Stabilitas dapat bertahan 5 hari pada suhu 15-25°C.

Prosedur *assay* dilakukan dengan mencampurkan 100  $\mu\text{L}$  sampel dan 1000  $\mu\text{L}$ , Kemudian dibaca absorbansi setelah 1 menit, 2 menit dan 3 menit. Pembacaan

absorbansi dengan menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 340 nm, 365 nm, 334 nm, *optical path* 1 cm, temperatur 37°C, pengukuran dibandingkan terhadap udara.

**Pemeriksaan kreatinin.** Kreatinin merupakan produk buangan dari filtrasi glomerulus dari ginjal. Konsentrasi kreatinin dalam plasma pada individu sehat secara konstan baik dan tidak tergantung dari pemasukan air, latihan maupun kecepatan produksi urine. Oleh karena itu peningkatan nilai kreatinin plasma selalu mengindikasikan penurunan ekskresi seperti kerusakan fungsi ginjal. Kreatinin dapat menunjukkan kecepatan filtrasi glomerulus (GFR : *Glomerular Filtration Rate*) yang baik, sehingga dapat digunakan untuk mendeteksi penyakit ginjal dan memonitor fungsi ginjal. Untuk tujuan ini kreatinin diukur secara simultan pada serum yang diambil pada periode waktu tertentu.

Metode menggunakan uji kinetik tanpa deproteinase menurut *Jaffe method*. Adapun prinsip kerja *Creatinine FS* adalah kreatinin membentuk kompleks warna oranye merah pada larutan alkalin pikrat. Perbedaan absorbansi pada waktu tertentu selama konversi adalah proporsional dengan konsentrasi kreatinin pada sampel.

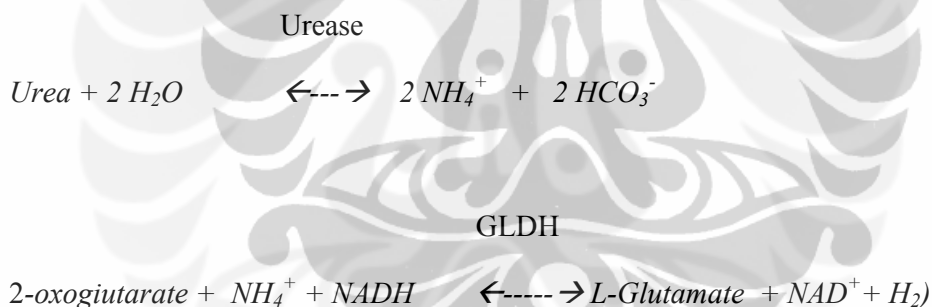


Adapun komponen dari reagen yang digunakan adalah R1 (reagen ke-1) terdiri dari *sodium hydroxide* 0,2 mmol/L, dan R2 (reagen ke-2) terdiri dari *picric acid* 20 mmol/L, dan standard 2 mg/dL (177  $\mu\text{mol/L}$ ). Reagen maupun standard disimpan pada suhu 2 - 25°C dan hindari dari kontaminasi, reagen tidak boleh dimasukkan dalam *freezer*.

Prosedur *assay* dilakukan dengan pembuatan *sample start* yaitu membuat terlebih dahulu *monoreagent* dengan mencampurkan 4 bagian R1 dan 1 bagian R2. *Monoreagent* stabil selama 5 jam pada suhu 15-25°C. Pembuatan *blank* terdiri dari 50  $\mu\text{L}$  dist. water dan 1000  $\mu\text{L}$  *monoreagent*. Sampel terdiri dari 50  $\mu\text{L}$  sample dicampurkan dengan 1000  $\mu\text{L}$  *monoreagent* dan dibaca absorbansi A1 setelah 60 detik, dan absorbansi A2 setelah 120 detik.  $\Delta A = (A2-A1)$  sampel. Pembacaan absorbansi dilakukan pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 490 nm, *optical path* 1 cm, temperatur 20-25°C dan pengukuran dilakukan dengan pengurangan terhadap reagen *blank*

**Pemeriksaan Urea.** Urea adalah nitrogen yang merupakan produk akhir katabolisme protein. Keadaan berhubungan dengan perubahan level urea dalam darah yang ditandai dengan *hyperuremia* atau *azotemia*. Penentuan nilai urea dan kreatinin secara paralel dapat menentukan perbedaan antara *pre-renal* dan *post-renal azotemia*. Pada *pre-renal azotemia* disebabkan oleh *dehydration*, peningkatan katabolisme protein. Perawatan dengan kortisol atau penurunan perfusi ginjal, dapat menyebabkan peningkatan level urea, sementara nilai kreatinin masih dalam jarak referensi. Pada *post-renal azotemia* disebabkan oleh kerusakan traktus urinarius, baik level urea maupun kreatinin meningkat, tetapi kreatinin meningkat dalam jumlah sedikit. Pada penyakit ginjal, konsentrasi urea meningkat ketika kecepatan filtrasi glomerulus menurun dan jumlah pemasukan protein lebih dari 200 g/hari.

Metode dengan *Urease-GLDH enzymatic UV-test*. Adapun prinsip kerja dari Urea FS adalah :



*GLDH* : *Glutamate dehydrogenase*

Komponen reagen yang digunakan ada 2 macam yaitu : 1). Reagen 1 terdiri dari *TRIS* pH 7,8 150 mmol/L, *2-oxoglutarate* 9 mmol/L, *ADP* 0,75 mmol/L, *Urease*  $\geq 7$  kU/L, *GLDH (Glutamate dehydrogenase)*  $\geq 1$  kU/L; 2). Reagen 2 terdiri dari *NADH* 1,3 mmol/L; 3) standard 50 mg/dL (8,33 mmol/L).

Pada tahap awal dibuat *monoreagen* terdiri dari 4 bagian R1 dan 1 bagian R2. *Monoreagen* tidak boleh kena cahaya. Stabilitas dapat bertahan 5 hari pada suhu 15-25°C. Biarkan *monoreagen* minimal 30 menit pada suhu 15-25°C sebelum digunakan.

Prosedur *assay* dilakukan dengan pembuatan *sample start* dengan membuat *blank* terdiri dari 1000  $\mu\text{L}$  *monoreagen* dan pembuatan sampel dengan mencampurkan 10  $\mu\text{L}$  *sample* dan 990  $\mu\text{L}$  *monoreagen*, kemudian keduanya diinkubasi 30-40 detik pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  lalu dibaca absorbansi  $A_1$ , dan setelah 60 detik dibaca absorbansi  $A_2$ .  $\Delta A = (A_2 - A_1)$  sampel. Pembacaan absorbansi dilakukan pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 340 nm, 334 nm, dan 365 nm, optical path 1 cm, temperatur  $25^{\circ}\text{C}$  /  $30^{\circ}\text{C}$  /  $37^{\circ}\text{C}$  dan pengukuran dilakukan dengan pengurangan terhadap *reagen blank*.

**Pengamatan histopatologi organ hati dan ginjal.** Dibuat sediaan histopatologi pada kaca objek dengan pewarnaan *hematoksilin-eosin* (HE), diamati dengan menggunakan mikroskop dan dilakukan pemotretan dengan kamera digital. Penilaian terhadap gambaran sediaan histopatologi organ hati dan ginjal, dilakukan secara deskriptif pada 5 ekor tikus. Adapun prosedur pembuatan sediaan : Fiksasi dengan cara organ direndam di dalam larutan fiksatif (*Bouin*) selama 48 jam. Volume larutan dengan volume organ yang akan difiksatif harus seimbang. Sediaan dicuci dengan alkohol 70% dan 96%. Dehidrasi dengan cara sediaan dimasukkan ke dalam larutan *serial* alkohol 60%, 70%, 80%, dan 96% berturut-turut masing-masing selama 30 menit.

Penjernihan (*clearing*) dengan cara sediaan dimasukkan ke dalam larutan xylol : paraffin = 1:1 dan xylol : paraffin = 1:3 masing-masing selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke dalam xilol murni selama 30 menit. Tahap selanjutnya adalah infiltrasi (di dalam oven), dengan cara organ dimasukkan ke dalam larutan xylol : paraffin = 1:1 selama 15 menit dan xylol : paraffin = 1:3 selama 15 menit. Setelah itu organ dimasukkan ke dalam paraffin cair I,II dan III masing-masing selama 20 menit.

Penanaman atau *embedding* dengan cara kotak kertas ukuran kecil diisi paraffin cair setengahnya, dibiarkan agak dingin, kemudian organ dimasukkan dan dituang lagi dengan paraffin cair sampai organ tertutup, gelombang udara yang terjadi dihilangkan dengan cara menusukkan sonde yang terlebih dahulu dipanaskan. Pemotongan sediaan dilakukan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5-10 $\mu$ . Selanjutnya dilakukan penempelan sayatan dengan cara tetesi kaca objek dengan

satu tetes *Meyers albumin*, kemudian diapus dengan jari tangan dan dikeringkan, diberi akuades satu tetes. Sayatan organ ditempelkan pada kaca objek dengan menggunakan pinset, kemudian dikeringkan di atas *heating plate*.

Terakhir dilakukan pewarnaan dengan cara : kaca objek yang sudah ditempel pita sayatan direndam dengan larutan xylol murni I dan II masing-masing selama 15 menit, selanjutnya direndam dalam seral alkohol 100%, 96%, 80% dan 70% berturut-turut masing masing selama 3 menit. Kemudian direndam dalam larutan hematoksilin selama 10-15 menit, dicuci dengan air mengalir (perlahan), dilihat di bawah mikroskop, apabila terjadi kelebihan warna dilarutkan dalam larutan HNO<sub>3</sub> 0.5%, lalu direndam dalam larutan alkohol 70% dan 80% masing-masing selama tiga menit, lalu dilanjutkan dengan direndam larutan eosin selama 10 menit, setelah itu sediaan dicelupkan ke dalam alkohol 90% kemudian dicelupkan ke dalam alkohol 100%, lalu sediaan direndam dalam larutan xylol murni I dan II masing-masing selama 15 menit. Terakhir sediaan dikeringkan, diberi satu tetes *Canada balsam* lalu ditutup dengan *cover glass*, dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop.

#### **4.8.8 Uji Toksisitas Khusus (Sitotoksisitas) Terhadap Sel Epitel dan Fibroblast**

##### **4.8.8.1 Bahan dan Alat Penelitian**

Bahan uji : ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan rentang konsentrasi 0,8 – 100%. Sel target adalah sel lini *HaCat* yang didapatkan dari *Section of Molecular Embryology, Graduate School of Medical and Dental Science, Tokyo Medical and Dental University* dan sel fibroblast didapat dari kultur primer gingiva rongga mulut manusia yang melekat pada akar gigi molar tiga paska odontektomi. Bahan meliputi media kultur lengkap yang terdiri dari *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose, Gibco)*, yang ditambahkan 10% *Fetal Bovine Serum (FBS, Bio West)*, 1% *penicillin streptomycin*, 1% *Ampotericin B* dan 1% *gentamicin (Gibco)*. Untuk uji MTT diperlukan powder MTT (Wallert and Provost Lab, Amerika), *Acidified (HCl)-isopropanolol 0.4N* dan *NaCl 0,9%*. Bahan lain adalah *Trypsin in HBSS 0.2%*, *Phosphate Buffer Saline (PBS) 10%*, etanol 70%, *MiliQ water steril, Dimethyl-sulfoxide (DMSO)*.

Alat yang digunakan adalah cawan kultur (100 mm, *tissue culture dish*), 96-*microwell plate* (Iwaki), filter (0,22 $\mu$ m), *disposable syringe* 50ml, tabung sentrifuse (15 ml dan 50 ml, Iwaki), tip pipet (10, 100, 1000 $\mu$ L), pipet, tabung *ependorf*, *biohazard set cabinet*, *vortex*, *waterbath* (Memmert), inkubator CO<sub>2</sub>, *centrifuge* (Thermo), *Microplate Reader* (Biorad), mikroskop *inverted* (Axiovert 40 CER), kamera, hemositometer.

#### 4.8.8.2 Cara Kerja

##### A. Persiapan Kultur

Sterilisasi alat: alat-alat seperti tip pipet, tabung *ependorf*, NaCl 0,9%, *MilliQ water*, dan wadah kaca disterilkan dengan otoklaf pada suhu 120°C, 120 menit. Sterilisasi *biohazard set cabinet*, *patry dish*, 96 *microwell plate*, pipet, tip pipet, *tube*, *disposable syringe*, dan perlengkapan lainnya diletakkan pada *biohazard* dengan sinar *ultra violet* selama 10 menit sebelum mulai.

Pembuatan medium kultur lengkap: proses ini dilakukan dalam *Biohazard set cabinet*. Campuran medium kultur lengkap seperti yang tercantum dalam bahan yaitu DMEM ditambahkan 10% FBS, 1% *Penicillin streptomycin*, 1% *ampotericin B*, dan 1% *gentamycin* difilter dengan filter (Sartorius 0,22 $\mu$ m) yang disambungkan dengan *dysposable syringe* 50 ml dan ditampung pada tabung *sentrifuse* 50 mL, kemudian disimpan dalam lemari pendingin.

##### B. Kultur Sel

###### B.1. Sel epitel.

Sel *HaCat* disimpan dalam *cryo vial* di tabung nitrogen cair, sebelum sel dipergunakan untuk uji sitotoksisitas, sel dikultur dahulu dalam cawan kultur sampai cukup tumbuh. Cara kerjanya adalah sebagai berikut : sel dari *cryo vial* dipindahkan dalam tabung sentrifuse (15 mL) kemudian ditambahkan medium lengkap 5-10 mL dan disentrifuse (2000 rpm 10 menit). Selanjutnya sel *pellet* dilarutkan dalam 1-2 mL medium lengkap dan dilakukan hitung jumlah sel dengan menggunakan hemositometer dan mikroskop. Sel dikultur pada cawan kultur (4x10<sup>6</sup> sel), dan diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) sampai sel cukup tumbuh dan medium kultur diganti setiap 2 hari sekali. Selanjutnya subkultur dilakukan beberapa kali sampai jumlah sel mencukupi untuk uji sitotoksisitas.<sup>149</sup>

## B.2. Sel fibroblast

Jaringan gingiva subepitel didapatkan dari gigi molar tiga rahang bawah segera setelah tindakan odontektomi. Gigi disertai jaringan lunak yang melekat pada akarnya dimasukkan pada NaCl 0,9% dan dibawa ke laboratorium untuk diproses kultur. Jaringan gingiva yang melekat pada gigi diambil dengan *scalpel*, kemudian dicuci dengan PBS. Jaringan gingiva dipotong-potong menjadi potongan-potongan kecil (1x1 mm) lalu diletakkan pada cawan kultur dan ditambahkan medium lengkap. Selanjutnya diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) sampai sel tumbuh dan berproliferasi. Sub kultur dilakukan beberapa kali sampai jumlah sel cukup untuk uji sitotoksitas.<sup>150</sup>

## C. Uji Sitotoksitas

### C.1 Persiapan Sel

Kedua sel target setelah cukup tumbuh pada cawan kultur, kemudian dipanen dengan cara sebagai berikut; medium kultur dibuang, kemudian sel dicuci dengan menambahkan 5 mL PBS steril pada cawan kultur sampai terendam, lalu PBS dibuang. Setelah itu tambahkan tripsin dalam HBSS (2 ml tiap cawan petri 100 mm), lalu diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) selama 5-10 menit untuk melepaskan sel dari dasar sumur kultur. Kemudian tambahkan medium DMEM lengkap 8 mL ke dalam sumur kultur, lalu sel dikoleksi ke dalam tabung sentrifuse (15 ml). Larutan medium lengkap yang berisi sel kemudian disentrifuse (2000 rpm, 20 menit). Sel pelet selanjutnya dilarutkan kembali dalam 2 mL medium komplet. Jumlah sel kemudian dihitung dengan cara yang sama seperti penghitungan sel sebelumnya. Untuk uji sitotoksitas sel dikultur pada 96 *well plate* dengan kepadatan sel 1x10<sup>5</sup> tiap well. Selanjutnya sel diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) sampai sel cukup tumbuh (Tahap tersebut dapat dilakukan 3-9 kali).

### C.2 Pemaparan bahan uji

Pembuatan bahan perlakuan dan kontrol: Dipersiapkan konsentrasi stok awal ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 100% (25 gram ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam 25 mL DMSO 1%). Lalu lakukan *serial dilution* konsentrasi 0,8%, 3,2%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% dengan medium komplet dalam *well plate*. Sebagai kontrol dipakai klorheksidin 0,1% dan 0,2%.

Pada sel yang telah cukup tumbuh dipaparkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sesuai konsentrasi uji. Selanjutnya sel diinkubasi selama 24 jam pada inkubator CO<sub>2</sub> (37°C 5% CO<sub>2</sub>). Penelitian dilakukan 3 kali secara terpisah (*independent*) dengan masing-masing *duplo*.

### C.3 Uji MTT

Siapkan larutan MTT dalam NaCl 0,9% dengan konsentrasi 5 mg/mL. Kemudian medium tiap well dibuang dan diganti dengan larutan MTT sebanyak 50µL/well, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> (37°C,5%CO<sub>2</sub>) selama 3 jam. Setelah itu tambahkan 150 µL larutan *acidified isopropanolol* 0.4 N. Setelah itu diinkubasi pada temperatur ruang pada *shaker* (50 rpm) selama 1 jam. Absorbansi dibaca dengan menggunakan alat *microplate Reader* pada panjang gelombang 490 nm. Nilai absorbansi atau *optical density* (OD) kelompok perlakuan dipersentasikan terhadap OD kelompok kontrol untuk menentukan nilai viabilitas sel, dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ viabilitas sel} = \frac{\text{nilai absorbansi kelompok perlakuan}}{\text{Nilai absorbansi kelompok kontrol}} \times 100$$

### C.4 Pembuatan bahan perlakuan dan kontrol

Dipersiapkan konsentrasi stok awal ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 100% (25 gram ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam 25 mL DMSO 1%). Lalu lakukan *serial dilution* konsentrasi 0,8%, 3,2%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% dengan medium komplit dalam *well plate*.

Sebagai kontrol dipakai klorheksidin 0,1% dan 0,2%.

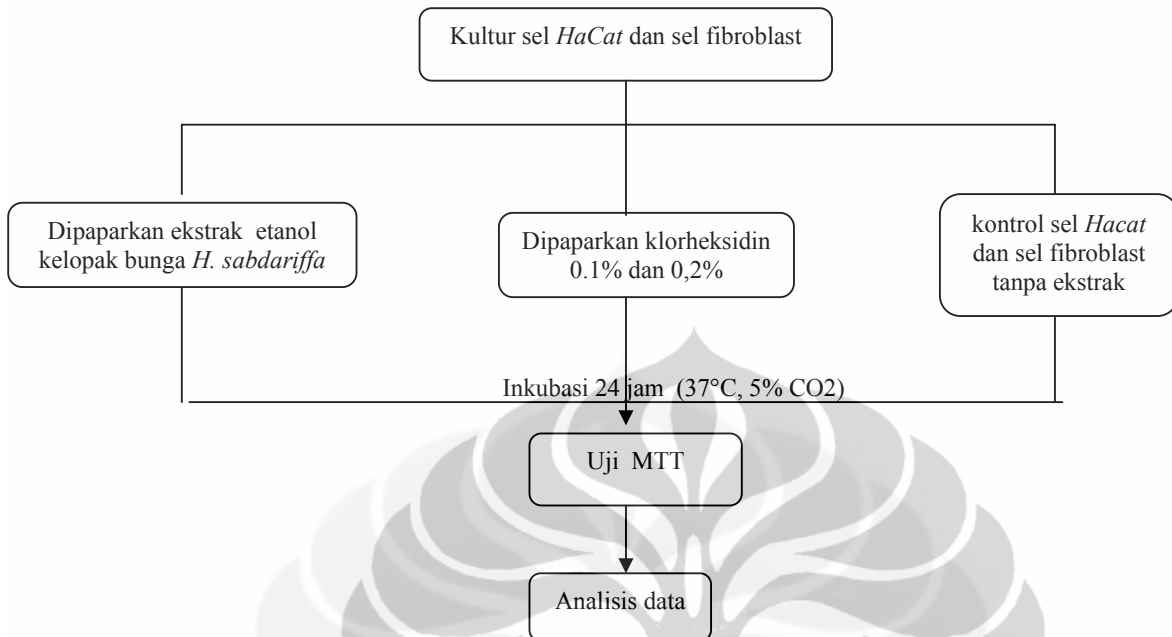
### C.5 Pemaparan Sampel Pada Sel

Pada sel yang telah cukup tumbuh dipaparkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sesuai konsentrasi uji. Selanjutnya sel diinkubasi selama 24 jam pada inkubator CO<sub>2</sub> (37°C 5% CO<sub>2</sub>). Penelitian dilakukan 3 kali secara terpisah (*independent*) dengan duplikasi perlakuan pada setiap kali pengulangan.

### D. Alur Uji Sitotoksitas

Alur Uji Sitotoksitas dapat dilihat pada gambar 4.12.





Gambar 4.12. Alur Uji Sitotoksitas

#### 4.8.9 Uji Biofilm dengan *Crystal Violet*

##### 4.8.9.1 Bahan dan Alat Penelitian

Subyek penelitian: *S. sanguinis* ATCC 10556. Bahan uji: ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam 7 dosis pengenceran yaitu: konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, klorheksidin 0,1% dan 0,2%. Bahan penunjang: BHI agar, alkohol 70%, akuades, DMSO 1% (Biomatik), *crystal violet* 4% (merck), etanol 96%, *Phospat Buffer Saline* (PBS, Biobasic Inc), saliva dari sukarelawan sehat.

Alat Penelitian : sengkelit, anaerobik jar, api bunsen, tip pipet (Eppendorf dan Biorad), otoklaf (Hirayama), cawan petri, gelas ukur, timbangan, mesin sentrifuge (Thermo dan Sorvalle Legend RT), *vortex mixer* (Biorad), *96-microwell plate Tissue Culture treated* (Iwaki), *microplate reader* (Biorad), labu erlenmeyer, kapas, tabung *centrifuse* 15 mL (Biologix), *disposable syringe filter* diameter 0,22  $\mu$ m (Sartorius minisart), mesin *centrifuged* (Sorvell), tip biru, kuning, putih (Biologix), *microcentrifuged tube* 1,5 mL (Biologix), inkubator (Memert), *vortex* (Biorad).

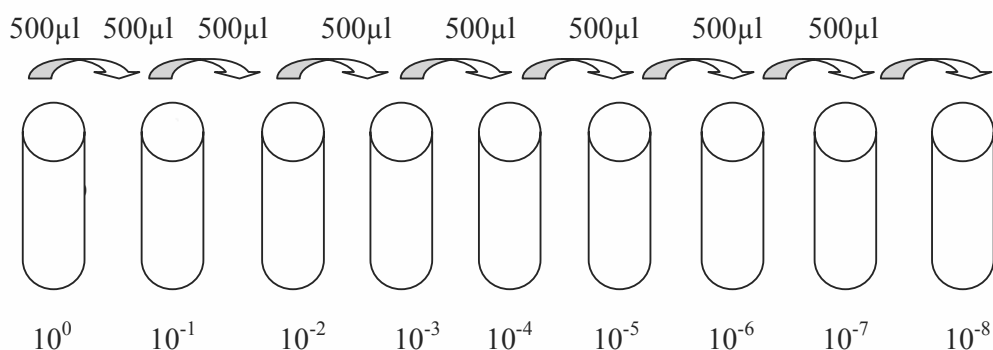
#### 4.8.9.2 Cara Kerja

##### a.1 Penentuan Konsentrasi *S. sanguinis* yang diujikan :

*Streptococcus sanguinis* didapatkan dari *S. sanguinis American Type Culture Collection* (ATCC 10556). Pertama dilakukan pembuatan suspensi *S. sanguinis* hingga pengenceran  $10^{-8}$  untuk menentukan pengenceran bakteri yang sesuai untuk penghitungan koloni. Persiapan media perbenihan : media perbenihan *S. sanguinis* yang digunakan adalah *Brain Heart Infusion* agar (BHI agar) dan *BHI broth*.

Pembiakan *S. sanguinis* : 10  $\mu$ L larutan stok *S. sanguinis* diteteskan ke permukaan BHI agar dan digores secara merata dengan sengkeli. Kemudian cawan petri tersebut dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* dan diisi gas CO<sub>2</sub> 10%, N<sub>2</sub> 80% dan O<sub>2</sub> 10%. *Anaerobic jar* diletakkan dalam inkubator (Memert) dengan suhu 37 °C selama 48 jam. Selanjutnya pembuatan larutan induk *S. sanguinis* yaitu dengan mengambil semua koloni bakteri dari biakan pada BHI agar dengan sengkeli dan dimasukkan dalam *centrifuge tube* berisi 1 mL BHI broth. Larutan induk disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya supernatan dibuang dan pada pellet bakteri ditambahkan 1 mL BHI broth dan dihomogenisasi dengan *vortexer*.

Pengenceran bakteri  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$  : dilakukan dengan menyiapkan 8 buah *tube* 15 mL dan BHI agar dengan label berurutan untuk suspensi bakteri  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$ . Masing-masing *tube* 15 mL diisi dengan 4500  $\mu$ l BHI broth. Larutan induk sebanyak 500  $\mu$ L dimasukkan pada tabung pertama dan dihomogenisasi dengan mini *vortexer* untuk mendapatkan suspensi bakteri  $10^{-1}$ . Dari suspensi tersebut, diambil 500  $\mu$ L untuk dimasukkan pada tabung kedua dan dihomogenisasi dengan mini *vortexer* sehingga diperoleh suspensi bakteri  $10^{-2}$ . Alur pengenceran bakteri dengan serial dilution dapat dilihat pada gambar 1. Dari tiap suspensi bakteri  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$ , diambil sebanyak 10  $\mu$ L untuk dimasukkan pada BHI agar lalu digores hingga merata dengan sengkeli. Kemudian cawan petri dimasukkan dalam *anaerobic jar* dan diisi gas CO<sub>2</sub>. *Anaerobic jar* diletakkan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam. pelaksanaan dilakukan secara *triplo*, dan diulang 3 kali secara *independent*.



Gambar 4.13. Alur Pengenceran Bakteri dengan Metode *Serial Dilution*

Penghitungan jumlah koloni *S. sanguinis* : Koloni *S. sanguinis* dari pengenceran bakteri  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$  yang dilakukan secara *triplo* dihitung dengan *colony counter* dan diambil nilai rata-ratanya. Berdasarkan pengamatan koloni yang terbentuk, koloni suspensi bakteri yang dapat dihitung dengan baik adalah pengenceran  $10^{-6}$ , maka pengenceran tersebut digunakan dalam eksperimen ini. Selain itu penghitungan juga dilakukan pemeriksaan dengan *microplate reader*. Hasil dibaca pada panjang gelombang 490 nm. Dilakukan penghitungan jumlah koloni atau CFU (*Colony Forming Unit*) dengan mengkonversikan hasilnya ke rumus CFU/mL  $(A \times 7.65) - 0.3 = X \times 10^9$  CFU/mL. Siapkan 6 *wheel-plate polysterine*, dimana 3 *wheel-plate* diisi masing-masing 200 µl BHI dan 3 *wheel* diisi masing-masing 200 µL  $10^{-6}$  bakteri. Untuk mendapatkan bakteri dengan pengenceran  $10^{-6}$  dilakukan pengenceran  $C_1V_1 = C_2V_2$ . Dimana  $C_1$  adalah konsentrasi awal,  $C_2$  adalah konsentrasi akhir,  $V_1$  adalah volume awal dan  $V_2$  adalah volume akhir. A adalah nilai rata-rata absorbansi.

$$(A \times 7.65) - 0.3 = X \cdot 10^9 \text{ CFU}$$

$$A = (0.468 + 0.537) : 2 = 0.5025$$

$$(A \times 7.65) - 0.3 = X \cdot 10^9 \text{ CFU}$$

$$(0.5025 \times 7.65) - 0.3 = 3.544 \cdot 10^9 \text{ CFU}$$

Kemudian dimasukkan dalam rumus :

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 3.544 \cdot 10^9 = 80 \text{ ml} \cdot 10^6$$

$$V_1 = (80 \cdot 10^6) : (3.544 \cdot 10^9)$$

$$= 230 \text{ µL}$$

Jadi pada masing-masing *centrifuge tube* diperlukan 230  $\mu\text{L}$  bakteri dan 79.770  $\mu\text{L}$  BHI broth

### a.2 Penentuan Konsentrasi Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. :

Konsentrasi yang digunakan dimulai dari 0,2%, selanjutnya 0,8%, 1,6%, 3,2%, 5,0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%. Larutan stok yang dibuat 50% (tabel 4.2). Disiapkan 10 *centrifuge tube* 15 mL yang diberi label sebagai wadah pengenceran ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L., *micropipette*, tip pipet, dan larutan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO).

Tabel 4.2. *Serial Dilution* Ekstrak Etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L dari stok 50%

No	Konsentrasi Awal (C1)%	Konsentrasi akhir (C2)%	vol ekstrak (V1) $\mu\text{L}$	vol medium $\mu\text{L}$	vol total (V2) $\mu\text{L}$
1	50%	kt (-)	-	3000	3000
2	50%	0,2%	12	2988	3000
3	10%	0,8%	48	2952	3000
4	10%	1,6%	96	2904	3000
5	10%	3,2%	192	2808	3000
6	10%	5,0%	300	2700	3000
7	10%	10%	600	2400	3000
8	10%	20%	1200	1800	3000
9	10%	30%	1800	1200	3000
10	10%	40%	2400	600	3000
11	10%	50%	3000	-	3000
12		KLH 0,1%	3000 KLH	-	3000 KLH
13		KLH 0,2%	3000 KLH	-	3000 KLH

Setelah selesai membuat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam konsentrasi 0,2% hingga 50%, maka *centrifuge tube* yang telah diberi larutan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L., *klorheksidin* 0,1% dan 0,2% dibungkus dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam lemari pendingin hingga saat akan digunakan.

Kontrol negatif adalah bakteri yang tidak diberi perlakuan apapun. Untuk kontrol positif, bakteri dipapar dengan *klorheksidin* 0,1% dan 0,2%.

### A.3 Menguji Viabilitas *Streptococcus sanguinis* Pada Biofilm

Pembuatan model *biofilm* terdiri dari 3 tahap yaitu : persiapan saliva, pembuatan pelikel, dan pemaparan bakteri. Persiapan saliva : saliva dari sukarelawan sehat (50 mL) ditampung pada *centrifuge tube* 15 mL dengan corong, kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 4500 rpm dan suhu 4°C. Selanjutnya supernatan dipindahkan ke tabung 50 mL yang baru.

Kemudian sampel saliva difilter dengan *filter sartorius* yang berdiameter 0.20 µm. Pada hasil penyaringan tersebut ditambahkan *Phenyl Methanesulfonyl Floride* (PMSF) dengan konsentrasi 1µmol sebagai *protease inhibitor*. PMSF yang ditambahkan berbanding 1:9 dengan saliva murni. Kemudian saliva dikultur pada media bakteri *Brain Heart Infusion* sebanyak 10µL saliva untuk mengetahui bahwa saliva yang didapat sudah tidak mengandung bakteri maupun jamur, kultur tersebut diinkubasi dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Selama menunggu hasil kultur, Sampel saliva disimpan dalam *freezer* dengan suhu -80 °C.

Setelah diketahui dari hasil kultur bahwa saliva tidak mengandung bakteri dan jamur, maka sampel saliva diencerkan dengan PBS 50x. Kemudian dilanjutkan dengan pembuatan model pelikel yaitu *coating* saliva. Masukkan 100 µL saliva pada tiap well (*96 microwell plate*), kemudian diletakkan di atas *orbital shaker* dengan kecepatan 80 rpm selama 90 menit di dalam inkubator suhu 37 °C. Kemudian *well* dibilas dengan 100 µL PBS sebanyak satu kali untuk menghilangkan pelikel yang tidak melekat pada dasar *plate*.

Setelah itu, dilakukan pemaparan bakteri pada pelikel dengan cara sebagai berikut : ditambahkan 100 µL suspensi bakteri pada masing-masing *well* pada 6 buah *96-microwell-plate*. Selanjutnya diletakkan dalam *anaerobic jar* yang diisi gas dan diinkubasi dalam suhu 37°C. Untuk fase *adherencece biofilm* (3 buah *96-microwell plate*) diinkubasi selama 20 jam, dan 3 buah *96-microwell plate* lainnya diinkubasi 24 jam (fase maturasi). Setelah diinkubasi, masing-masing *well* dibilas satu kali dengan PBS 100 µL untuk membuang bakteri *planktonic*.

### A.4 Pemaparan Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L terhadap *S. sanguinis*

Untuk uji efektifitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dilakukan dengan cara sebagai berikut : tiap *well* yang telah terbentuk *biofilm*, dipaparkan 100

$\mu\text{L}$  ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dan diinkubasi selama 1 jam. Pada kontrol positif dipaparkan 100  $\mu\text{L}$  klorheksidin 0.1% atau 0.2%. Pada kontrol negatif, tidak diberikan agen antibakteri dan hanya diinkubasi dengan medium. Perlakuan ini dilakukan secara triplo dan diulang sebanyak 3 kali. Kemudian *wellplate* diinkubasi selama 1 jam dan suhu 37°C dan diletakkan di dalam *anerobic* yang diisi gas. Setelah itu, *well* dicuci dengan PBS 100  $\mu\text{L}$  sebanyak 1 kali.

#### A.5 Uji *crystal violet*

Siapkan larutan *crystal violet* 4% dalam akuades dan etanol 96%. Pada tiap well yang telah dicuci masing-masing dimasukkan 200  $\mu\text{L}$  *crystal violet* 4% dan diinkubasi di suhu ruang selama 45 menit. *Crystal violet* kemudian dibuang dan dibilas dengan akuades 100  $\mu\text{L}$  sebanyak dua kali. Selanjutnya 200  $\mu\text{L}$  etanol 96% dimasukkan pada masing-masing well dan diinkubasi pada suhu ruang selama 45 menit, kemudian *optical density* dibaca di *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm.

#### D. Alur Uji Biofilm

Adapun alur uji biofilm dapat dilihat pada tabel 4.14.

#### 4.9 Pengolahan dan Analisis Data

Pengolahan data ada 2 macam yaitu :

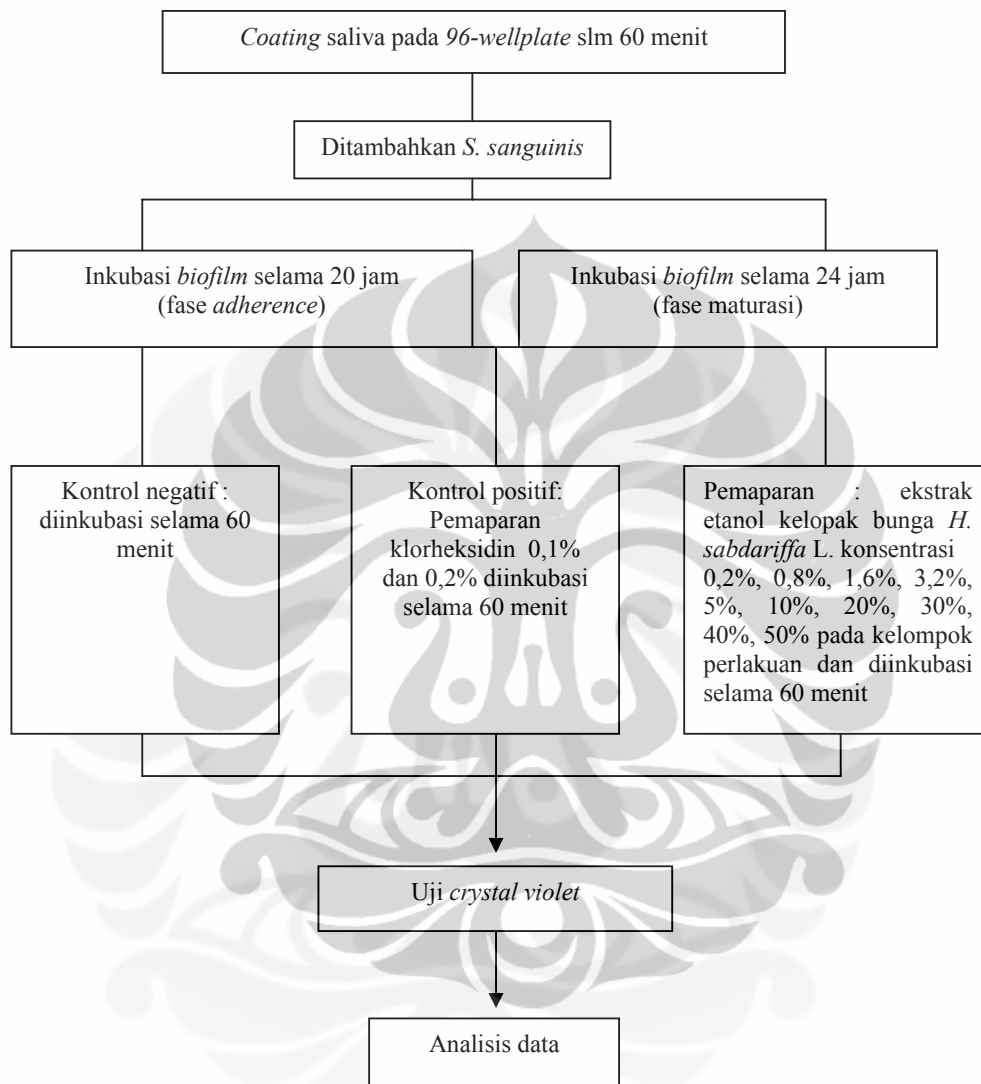
##### 1. Pengolahan data secara deskriptif

Pengolahan data secara deskriptif dilakukan pada data : skrining fitokimia, Parameter standar ekstrak, uji KHM dan KBM, uji toksisitas akut, pemeriksaan histopatologis, uji toksisitas subkronis.

##### 2. Pengolahan data secara analisis

Pengolahan data secara analisis dilakukan pada data : zona hambat, uji toksisitas subkronis, uji sitotoksitas sel *HaCat* dan fibroblast, uji biofilm. Untuk data zona hambat, sitotoksitas dan uji biofilm dengan distribusi data normal digunakan uji *one way anova*, dan untuk melihat perbedaan antar kelompok digunakan uji *Post Hoc t*. Untuk uji Toksisitas subkronis digunakan uji *Kruskal Wallis* dan untuk

melihat perbedaan antar kelompok digunakan *Mann Whitney*. Seluruh uji menggunakan batas keamanan  $\alpha$  0,05



Gambar 4.14. Alur Uji *Biofilm*

#### 4.10 Masalah Etika

Dalam pelaksanaan penelitian mendapatkan ijin dari Tim Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, dan dinyatakan lolos etik dengan no. 32/Ethical Clearance/FKGUI/VI/2011 (lampiran 1).

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1. Identifikasi Tanaman dan Analisis fitokimia Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *Hibiscus sabdariffa* L.

Hasil identifikasi atau determinasi tumbuhan yang dilakukan oleh Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor terhadap tumbuhan *H. sabdariffa* L yang diperoleh dari Balai Tanaman Obat dan Aromatik Ballitro Bogor, dinyatakan bahwa tumbuhan tersebut tergolong jenis *Hibiscus sabdariffa* L., termasuk dalam suku *Malvaceae*. Hasil uji determinasi dalam bentuk sertifikat determinasi (lampiran 2).

Hasil pemeriksaan secara kualitatif dan semi kuantitatif menunjukkan bahwa Ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. dengan metode maserasi etanol 70% mengandung golongan senyawa : saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida (lampiran 3).

Pada pemeriksaan semi kuantitatif<sup>41</sup> ditemukan golongan senyawa : saponin dengan hasil positif 4 (++++) dengan bahan pembanding buah lerak (*Sapindus rarak*). Tanin diperoleh dengan positif 3 (+++) dengan bahan pembanding buah pinang (*Areca cathechin*). Fenolik diperoleh dengan hasil positif 3 (+++) dengan bahan pembanding bunga cengkih (*Syzygium aromaticum*). Flavonoid diperoleh dengan hasil positif 3 (+++) dengan bahan pembanding kulit jeruk (*Citrus sp*). Triterpenoid diperoleh dengan hasil positif 4 (++++) dengan bahan pembanding daun pegagan (*Centella asiatica* L.) dan glikosida diperoleh dengan hasil positif 2 (++) dengan bahan pembanding daun digitalis (*Digitalis purpurea*).

Nilai bahan pembanding adalah positif 4 (++++). Kandungan saponin setara dengan buah lerak. Kandungan tanin  $\frac{3}{4}$  kali buah pinang. Kandungan fenolik  $\frac{3}{4}$  kali bunga cengkih. Kandungan flavonoid  $\frac{3}{4}$  kali kulit jeruk. Kandungan triterpenoid setara dengan daun pegagan. Kandungan glikosida  $\frac{1}{2}$  kali daun digitalis.



Tabel 5.1. Kandungan Golongan Senyawa Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

No	Golongan senyawa	Semi kuantitatif	Pembanding
1	Saponin	++++	buah lerak ( <i>Sapindus rarak</i> )
2	Tanin	+++	buah pinang ( <i>Areca catechin</i> )
3	Fenolik	+++	bunga cengkih ( <i>Syzygium aromaticum</i> )
4	Flavonoid	+++	kulit jeruk ( <i>Citrus</i> sp)
5	Triterfenoid	++++	daun pegagan ( <i>Centella asiatica</i> L)
6	Glikosida	++	daun digitalis ( <i>Digitalis purpurea</i> )

Keterangan :

1. Saponin memiliki nilai positif 4 (++++) dibandingkan dengan buah lerak
2. Tanin memiliki nilai positif 3 (+++) dibandingkan dengan buah pinang
3. Fenolik memiliki nilai positif 1 (+++) dibandingkan dengan bunga cengkih
4. Flavonoid memiliki nilai positif 3 (+++) dibandingkan dengan kulit jeruk
5. Triterfenoid memiliki nilai positif 4 (++++) dibandingkan dengan daun pegagan
6. Glikosida memiliki nilai positif 2 (++) dibandingkan dengan daun digitalis

Dengan demikian hipotesis ke-1 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. mengandung golongan senyawa aktif yang bersifat anti-bakteri yaitu saponin, tanin, fenolik, flavonoid.

## 5.2. Parameter Standar Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *Hibiscus sabdariffa* L.

Hasil Pemeriksaan terhadap parameter standarisasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat dilihat pada tabel 5.2. Hasil pemeriksaan parameter standarisasi terhadap ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. ini merupakan nilai parameter ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L (lampiran 4).

Dengan demikian hipotesis ke-2 telah dibuktikan bahwa parameter standar ekstrak etanol Kelopak bunga *H. sabdariffa* L dapat ditetapkan.

Tabel 5.2. Hasil Pemeriksaan Parameter Standarisasi Ekstrak etanol *Hibiscus sabdariffa* L

Parameter standarisasi	Hasil/nilai ekstrak
A.Parameter non spesifik	
(1) susut pengeringan	22,2 %
(2) bobot jenis	0,9036 g/ml
(3) kadar air	8,03 %
(4) kadar abu	8,13 %
B.Parameter spesifik	
(1) identitas	Nama latin : <i>Hibiscus sabdariffa</i> L Nama bahan : kelopak <i>H.sabdariffa</i> L Bagian tanaman yang digunakan : kelopak bunga
(2) organoleptik	Bentuk : cairan kental hitam Warna : hitam Rasa : asam dengan pH 5,2 Bau : manisan

### 5.3. Analisis metode dilusi untuk kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) serta metode difusi untuk zona hambat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* ATCC 10556

#### 5.3.1. Hasil Uji KHM dan KBM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan metode dilusi

Uji KHM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dilakukan dalam 7 konsentrasi yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%. Uji KHM dilakukan dengan pengamatan visual untuk melihat kekeruhan pada tabung reaksi. Kekeruhan menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (tanda +), sedangkan tanda (-) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Hasil KHM ekstrak etanol terhadap *S. sanguinis* diperoleh pada konsentrasi 0,78%, artinya konsentrasi minimum ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dapat menghambat pertumbuhan *S. sanguinis* adalah pada konsentrasi 0,78 %. Pada kontrol positif klorheksidin 0,1% pada tabung terlihat 1 tabung mengalami sedikit kekeruhan, pada klorheksidin 0,2% tidak ada pertumbuhan bakteri, sedangkan pada kontrol dengan media terdapat pertumbuhan bakteri (tabel 5.3. dan tabel 5.4.).

Tabel 5.3 Hasil KHM Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

No tabung	ekstrak etanol							kontrol		media
	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	KLH 0,1%	KLH 0,2%	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Keterangan :

- (-) = tidak ada pertumbuhan *S. sanguinis*
- (+) = ada pertumbuhan *S. sanguinis*
- KHM dan KBM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* adalah 0,78%

Tabel 5.4 Penetapan KHM dan KBM Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L. Berdasarkan Penggoresan Pada Plat Agar

No Tabung	ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L.				kontrol		media
	6,25	3,12	1,56	0,78	CHX 0,1%	CHX 0,2%	
1	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-	+

Keterangan :

- (-) = tidak ada pertumbuhan *S. sanguinis*
- (+) = ada pertumbuhan *S. sanguinis*
- KHM dan KBM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* sama yaitu 0,78%

Uji Kadar Bunuh Minimal (KBM) dilakukan dengan menggores semua hasil biakan pada media *thyoglycollate broth* di dalam cawan petri, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator. Hasil uji KBM yang diperoleh sama dengan hasil uji KHM yaitu pada konsentrasi 0,78%.

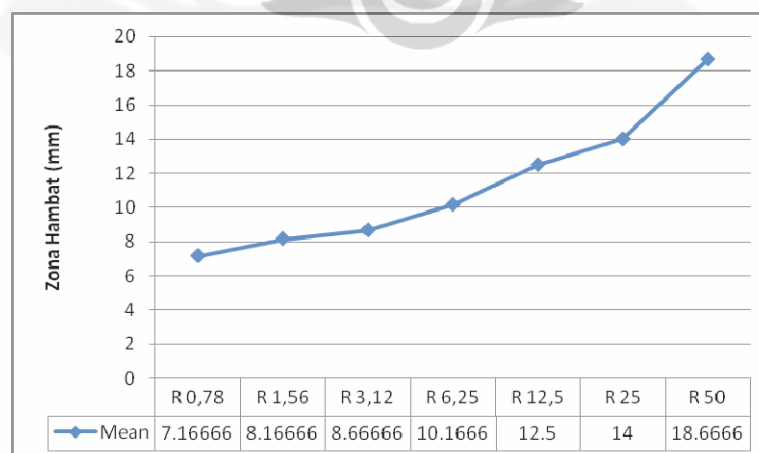
### 5.3.2 Hasil Penentuan zona hambat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* dengan metode difusi

Hasil pengukuran rerata diameter zona hambat yang dibentuk oleh ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berbagai konsentrasi terhadap *S. sanguinis* dengan uji difusi dan nilai kemaknaan hasil uji *oneway anova* dapat dilihat pada tabel 5.5 dan gambar 5.1

Tabel 5.5 Rerata Diameter Zona Hambat Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Terhadap *S. sanguinis* dan Nilai Kemaknaannya

No	konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L	rata-rata diameter zona hambat (mm)	Standar deviasi	p dibanding kontrol(-)	p dibanding KLH 0,1%	p dibanding KLH 0,2%
1	R 0,78%	7,166	0,288	0,000*	0,000*	0,000*
2	R 1,56%	8,166	0,288	0,000*	0,004*	0,000*
3	R 3,12%	8,666	0,577	0,000*	0,038*	0,000*
4	R 6,25%	10,166	0,288	0,000*	1,000	0,001*
5	R 12,5%	12,5	0,5	0,000*	0,004*	1,000
6	R 25%	14	1	0,000*	0,000*	0,150
7	R 50%	18,666	0,577	0,000*	0,000*	0,000*
8	KLH 0,1%	10,333	0,577	0,003*	-	0,003*
9	KLH 0,2%	12,666	0,577	0,003*	0,003*	-
	<i>Blanc disc</i>	0	0	-	0,003*	0,003*

\*( $p < 0,05$ ) perbedaan bermakna  
Kontrol (-) : *blank disc*



Gambar 5.1. Grafik Rerata Zona Hambat (mm) Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis*

Seperti terlihat pada tabel 5.5. dan gambar 5.1. bahwa semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dipaparkan terhadap *S. sanguinis*, maka diameter zona hambat yang dihasilkan semakin besar. Diameter zona hambat terbesar diberikan oleh ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 50% yang menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 18,666 mm. Diameter zona hambat pada klorheksidin 0,1% sebesar 10,33 mm, sedangkan diameter zona hambat pada klorheksidin 0,2% sebesar 12,666 mm.

Pada tabel 5.5. terlihat hasil uji statistik dengan *one way anova*, dibandingkan dengan kontrol positif klorheksidin 0,1% dan 0,2%. Dengan uji *one way anova*, p dibandingkan dengan klorheksidin 0,1% menunjukkan adanya peningkatan zona hambat terjadi sesuai peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. secara bermakna ( $p < 0,05$ ), kecuali pada konsentrasi 6,25%. ( $p = 1,000 > 0,05$ ) tidak berbeda bermakna, sedangkan dibandingkan dengan kontrol positif klorheksidin 0,2%, peningkatan zona hambat terjadi sesuai peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ), kecuali pada konsentrasi 12,5% ( $p = 1,000 > 0,05$ ), dan konsentrasi 25% ( $p = 0,150 > 0,05$ ).

Diameter zona hambat pada klorheksidin 0,1% sebesar 10,33 mm setara dengan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. konsentrasi 6,25% sebesar 10,1666 mm tidak berbeda bermakna ( $p = 1,000 > 0,05$ ), sedangkan diameter zona hambat pada klorheksidin 0,2% sebesar 12,666 mm setara dengan ekstrak etanol konsentrasi 12,5% sebesar 12,5mm tidak berbeda bermakna ( $p = 1,000 > 0,05$ ).

Dengan demikian, hipotesis ke-3 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. memiliki konsentrasi bakteriosatik dan bakterisidal tertentu melalui uji Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Uji Kadar Bunuh Minimal (KBM) terhadap *Streptococcus sanguinis* galur ATCC 10556, dengan hasil yaitu : KHM dan KBM sebesar 0,78%. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai zona hambat terhadap *S. sanguinis*.

#### 5.4. Uji Toksisitas Akut Pada Tikus *Sprague-Dawley*

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan toksisitas akut ( $LD_{50}$ ) ekstrak etanol kelopak *Hibiscus sabdariffa* L. Pemberian diberikan secara oral pada tikus putih *Sprague-Dawley*. Pemeriksaan dilakukan menurut OECD (*Organization for*

*Economic Cooperation and Development) Guidelines for Testing of Chemical Section 4, Health Effects, 1981*). Pada pengujian toksisitas akut dilakukan pengamatan terhadap mortalitas tikus dan perilaku tikus selama 14 hari pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Pada penelitian ini digunakan hewan coba 5 ekor tikus *Sprague-Dawley* jantan berusia sekitar 2-3 bulan, berat badan 156-214 gram. Tikus didapatkan dari Balai POM Departemen Kesehatan, Jakarta, Indonesia. Kemudian hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari di dalam laboratorium pemeriksaan dengan pemberian makanan standar dan minum secukupnya. Selama percobaan tikus diberi makan dan minum secukupnya, kecuali sekitar 17-20 jam sebelum pemeriksaan, tikus dipuaskan dan hanya diberi air minum saja. Bahan uji digunakan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan maksimal dosis 15 g/kg BB, diberikan secara oral melalui sonde lambung.

Pengamatan klinis dan terjadinya kematian dilakukan pada 1, 2 dan 4 jam setelah pemberian bahan yang diuji. Pengamatan yang sama dilanjutkan setiap hari sekali selama 14 hari. Pada hari ke-14 tidak ditemukan kematian pada hewan coba (Tabel 5.6.)

Tabel 5.6. Pengamatan Mortalitas Tikus yang Diberi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

Jenis kelamin Tikus	Jumlah Tikus	Dosis (g/kgBB)	Berat badan tikus Rata-rata (g)		Jumlah Kematian/ jumlah hewan coba
			Sebelum	sesudah	
Jantan	5	15	196,8	212,2	0/5

*Lethal Dose* <sub>50</sub> (LD50) oral ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. pada tikus lebih dari 15 g/kgBB

#### 5.4.1 Pengamatan Motorik :

Segera setelah pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. per oral dengan dosis 15 g/kg BB, tampak hewan coba dalam keadaan aktif, dan tampak feses encer. Aktivitas motorik menurun 1 jam setelah diberikan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L., tikus terlihat lesu dan tidak aktif. Setelah 2 jam tikus

aktif kembali seperti biasa. Pada 24 jam tampak tikus aktif, feses encer. feses didapatkan normal setelah hari ke-3. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai hari ke-14, tidak ditemukan perbedaan perilaku.

#### **5.4.2 Pengamatan Berat Badan :**

Rata-rata berat badan awal 196,8 gram. Berat badan menurun selama dua hari, selanjutnya pada hari ke-3 berat badan meningkat kembali secara bertahap sampai akhir pengamatan. Pada akhir pengamatan berat badan tikus meningkat selama penelitian, rata-rata 212,2 gram.

#### **5.4.3 Pengamatan Mortalitas :**

Pada akhir pengamatan di hari ke-14 persentase mortalitas adalah 0%, artinya tidak ada kematian tikus selama 14 hari.

#### **5.4.4 Pemeriksaan Makroskopis :**

Pada akhir periode observasi, semua hewan coba didekapitasi dan dilakukan pemeriksaan makroskopis terhadap seluruh organ dalam. Hasilnya tidak ditemukan kelainan pada organ hati, ginjal, paru, limpa, jantung, otak dan usus (gambar 5.2.).



Gambar 5.2. Gambaran Makroskopis Organ Tampak Warna dan Bentuk Organ Tidak Ada Kelainan

Dengan demikian, hipotesis ke-4 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. tidak toksik terhadap organ vital tikus dalam jangka waktu pendek, dan didapatkan  $LD_{50} > 15$  g/kg BB.

### 5.5 Uji Toksisitas Subkronis Pada Tikus *Sprague-Dawley*

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan keamanan suatu akumulasi obat. Pemberian diberikan secara oral pada tikus *Sprague-Dawley*. Pemeriksaan dilakukan menurut OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) *Guidelines for Testing of Chemical Section 4, Health Effects, 1981*). Pada pengujian toksisitas subkronis dilakukan pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. diberikan secara per oral melalui sonde lambung dalam bentuk cairan dengan volume dibawah 1% BB sekali pemberian.

Pada penelitian ini digunakan 40 ekor tikus *Sprague-Dawley* jantan dan betina didapatkan dari Balai POM Departemen Kesehatan, Jakarta dengan usia 2-3 bulan dengan berat berkisar 140-180 gram. Tikus dibagi 4 kelompok secara acak dan masing-masing terdiri dari 10 ekor, 5 ekor jantan dan 5 ekor betina. Kelompok I, II, III mendapatkan bahan uji dan kelompok IV sebagai kontrol. Kemudian hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari di dalam laboratorium pemeriksaan dengan pemberian makanan standar dan minum secukupnya. Selama percobaan tikus diberi makan dan minum secukupnya, kecuali sekitar 17-20 jam sebelum pemeriksaan, tikus dipuaskan dan hanya diberi air minum saja.

Pada kelompok I terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina dengan dosis 1,25 g/kgBB. Kelompok II terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina dengan dosis 2,5 g/kgBB. Pada kelompok III terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina dengan dosis 5 g/kgBB. Kelompok IV terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina kontrol.

Pemberian ekstrak dilakukan selama 30 hari. Pengamatan dilakukan selama 30 hari meliputi penimbangan berat badan setiap hari. Berat badan yang dinilai adalah hari ke 0 dan hari ke 30. Tingkah laku dan gejala klinik diamati setiap hari mengikuti tabel *McNamara*. Pada akhir pengujian tikus didekapitasi dan darahnya diambil. Pengambilan darah dilakukan untuk pemeriksaan hemoglobin, leukosit, SGOT, SGPT, kreatinin dan ureum. Organ-organ dalam seperti hati, ginjal, jantung, paru, limpa, otak, usus diambil, dibersihkan dari jaringan sekitarnya, ditimbang dan



difiksasi dengan larutan formalin 10%. Selanjutnya diambil sepotong jaringan dari setiap organ dan di dehidrasi dalam larutan alkohol encer sampai pekat dan dicetak dalam blok parafin menurut metode baku rutin. Selanjutnya dipotong dengan mikrotom untuk pembuatan sediaan dan diwarnai dengan hematoksilin dan eosin. Selanjutnya dilakukan analisis hasil. Perbandingan nilai seluruh kelompok dinilai dengan metode statistik *Kruskal Wallis* dengan derajat kemaknaan 0,05. Hasil pengujian toksisitas subkronis sebagai berikut :

### 5.5.1 Pengamatan Tingkah Laku, Gejala Klinik, dan Mortalitas

Hasil pengamatan perilaku selama 30 hari pada semua kelompok tidak menunjukkan kelainan. Tidak ditemukan kematian pada semua hewan coba baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa secara umum tidak ada perbedaan perilaku antara kelompok uji dan kelompok kontrol.

### 5.5.2 Pengamatan Berat badan

Pengamatan berat badan pada tikus jantan dan betina dilakukan setiap hari sampai hari ke-30. Tabel pengamatan berat badan dapat dilihat pada tabel 5.7.

Tabel 5.7. Berat Badan Rata-Rata Tikus Jantan dan Betina (gram,  $\bar{x} \pm SD$ )

Jenis kelamin	Hari ke	kontrol (K)	ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L.			p antar kel
			dosis 1,25 g/kgBB	dosis 2,5 g/kgBB	dosis 5 g/kgBB	
Jantan	1	150,4±11,82	150,4±13,41 (p=1,00)	150,8±15,52 (p=1,00)	153,2±17,13 (p=0,993)	0,98
	30	184,8±17,95	199,2 ±14,99 (p=0,68)	188 ±16,87 (p=0,994)	198 ±21,83 (p=0,740)	0,62
Betina	1	160±14,91	158,8±19,49 (p=1,00)	146,4±11,89 (p=0,655)	157,2±18,48 (p=0,995)	0,58
	30	187,2±16,90	184 ±18,54 (p=0,993)	174 ±8,09 (p=0,677)	182 ±19,91 (p=0,970)	0,74

p antar kelompok ( $p > 0,05$ ) : Tidak ada perbedaan bermakna berat badan tikus jantan dan betina pada hari ke-1 dan ke-30 antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Pada probabilitas *post hoc* ( $p$  dalam tanda kurung) masing-masing kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Pada hari ke-0, keempat kelompok tikus baik jantan maupun betina mempunyai rata-rata berat badan jantan  $151,2 \pm 14,66$  g dan tikus betina  $155,6 \pm 17,33$  g. Pada hari ke-30, keempat kelompok tikus baik jantan maupun betina mempunyai rata-rata berat badan jantan  $192,5 \pm 19,12$  g dan tikus betina  $181,8 \pm 17,22$  g. Terdapat kenaikan berat badan baik pada tikus jantan dan betina.

#### **Tikus Jantan:**

Pada hari ke-0, berat badan tikus jantan kelompok kontrol ( $150,4 \pm 11,82$  g), kelompok 1,25 g/kg BB ( $150,4 \pm 13,41$  g), kelompok 2,5 g/kg BB ( $150,8 \pm 15,52$  g), kelompok 5 g/kgBB ( $153,2 \pm 17,13$  g), seperti pada tabel 5.7. Tidak terdapat perbedaan berat badan secara bermakna antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Berat badan tikus yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol ( $p > 0,05$ ).

Pada hari ke-30, berat badan tikus jantan kelompok kontrol ( $184,8 \pm 17,95$  g), kelompok 1,25 g/kg BB ( $199,2 \pm 14,99$  g), kelompok 2,5 g/kg BB ( $188 \pm 16,87$  g), kelompok 5 g/kg BB ( $198 \pm 21,83$  g) seperti pada tabel 5.7. Tidak terdapat perbedaan berat badan secara bermakna antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Berat badan tikus yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol ( $p > 0,05$ ).

Pada tikus jantan berdasarkan hasil *Kruskal-Wallis* diketahui bahwa tidak ada perbedaan berat badan pada setiap kelompok perlakuan, atau dengan kata lain penambahan berat badan tikus betina tidak dipengaruhi oleh adanya perlakuan baik pada kelompok kontrol, 1,25 g/kg BB, 2,5 g/kg BB, 5 g/kg BB ( $p > 0,05$ ) seperti terlihat pada tabel 5.7.

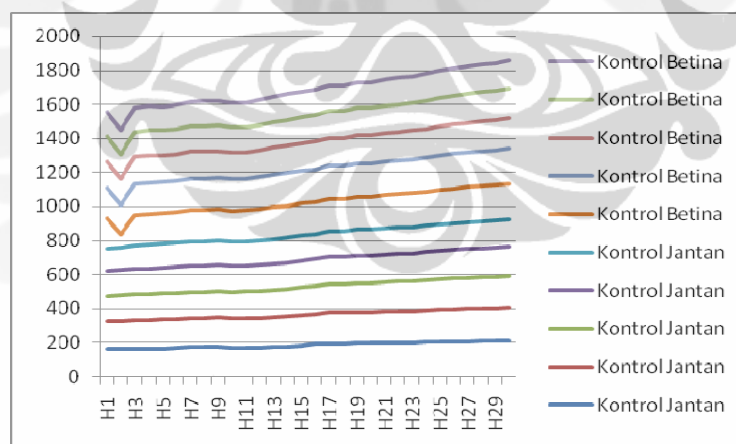
#### **Tikus Betina:**

Pada hari ke-0, berat badan tikus kelompok kontrol ( $160 \pm 14,91$  g), kelompok 1,25 g/kg BB ( $158,8 \pm 19,49$  g), kelompok 2,5 g/kgBB ( $146,4 \pm 11,89$  g) dan kelompok 5 g/kgBB ( $157,2 \pm 18,48$  g) seperti pada tabel 5.7. Tidak terdapat perbedaan berat badan secara bermakna antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Berat badan tikus yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol ( $p > 0,05$ ).

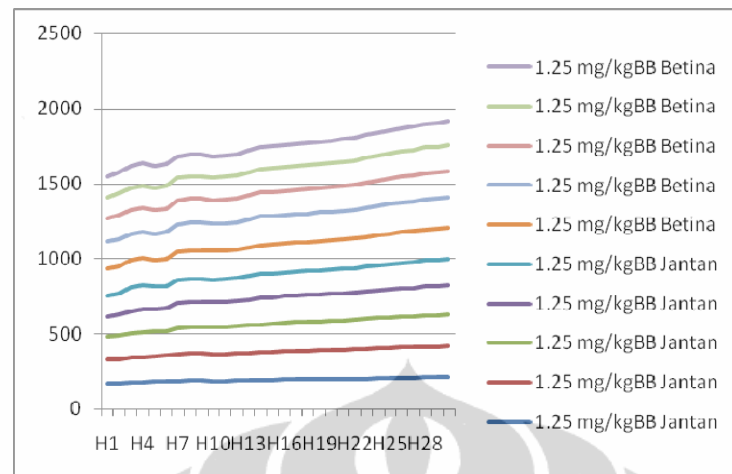
Pada hari ke-30, berat badan tikus kelompok kontrol ( $187,2 \pm 16,90$  g), kelompok 1,25 g/kgBB ( $184 \pm 18,54$  g), kelompok 2,5 g/kgBB ( $174 \pm 8,09$  g), kelompok 5 g/kgBB ( $182 \pm 19,91$  g) seperti pada tabel 5.7. Tidak terdapat perbedaan berat badan secara bermakna antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Berat badan tikus yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.. tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol ( $p > 0,05$ ).

Pada tikus betina berdasarkan hasil *Kruskal-Wallis* diketahui bahwa tidak ada perbedaan berat badan pada setiap kelompok perlakuan, atau dengan kata lain penambahan berat badan tikus betina tidak dipengaruhi oleh adanya perlakuan baik pada kelompok kontrol, 1,25 g/kg BB, 2,5 g/kg BB, 5 g/kg BB ( $p > 0,05$ ) seperti terlihat pada tabel 5.7.

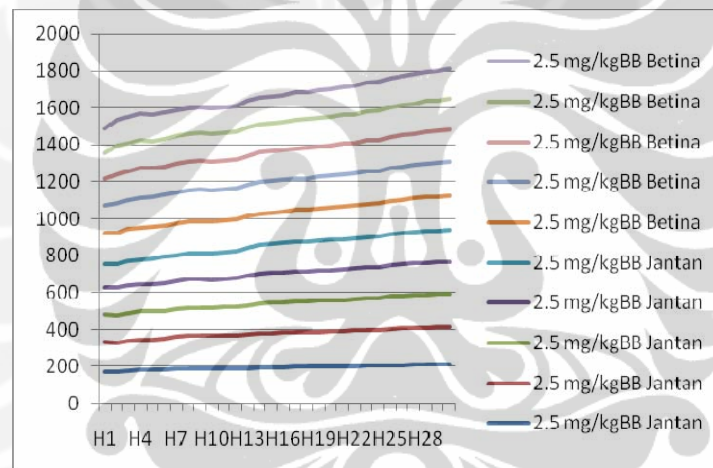
Pada tikus jantan dan betina berdasarkan hasil uji *Kruskal-Wallis* diketahui bahwa tidak ada perbedaan berat badan pada setiap kelompok perlakuan, atau dengan kata lain penambahan berat badan tikus jantan dan betina tidak dipengaruhi oleh adanya perlakuan baik pada kelompok kontrol, 1,25 g/kg BB, 2,5 g/kg BB, 5 g/kg BB seperti terlihat pada gambar 5.3. sampai 5.6.



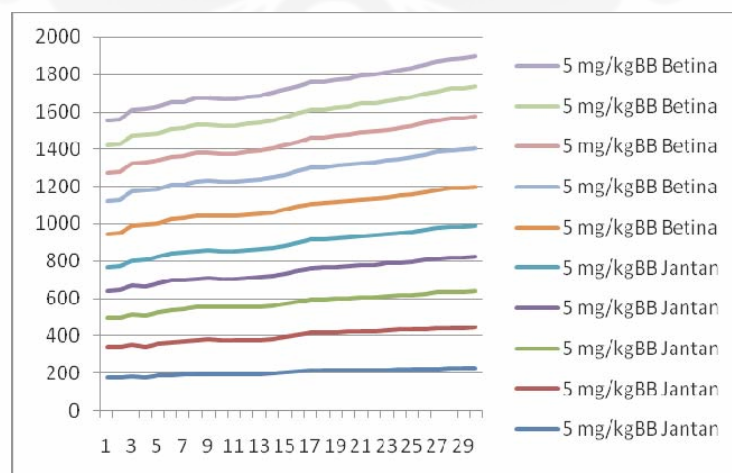
Gambar 5.3. Perkembangan Berat Badan Tikus pada Kelompok Kontrol



Gambar 5.4. Perkembangan Berat Badan Tikus pada Kelompok 1,25 g/kg BB



Gambar 5.5. Perkembangan Berat Badan Tikus pada Kelompok 2,5 g/kg BB



Gambar 5.6. Perkembangan Berat Badan Tikus pada Kelompok 5 g/kg BB

### 5.5.3. Sistem Hemopoetik atau Karakteristik Darah

Hasil pemeriksaan hemopoetik atau karakteristik darah pada tikus jantan dan betina seperti pemeriksaan hemoglobin dan leukosit dapat dilihat pada tabel 5.8.

Tabel 5.8. Nilai Rata-Rata Hb dan Leukosit ( $\bar{x}\pm SD$ ) Tikus Jantan dan Betina Setelah Pemberian Ekstrak Etanol Kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Parameter		kontrol (K)	ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L.			p antar kelompok
			dosis 1,25g/kg	dosis 2,5g/kg	dosis 5 g/kg	
Hb	Jantan	14,08±0,20	13,74±0,69 (p=0,421)	13,88±0,65 (p=1,000)	13,72±0,44 (p=0,310)	0,76
(g%)	Betina	14,08±0,27	13,68±0,65 (p=0,548)	13,96±0,34 (p=0,690)	14,24±0,44 (p=0,69)	0,71
Lekosit	Jantan	17.160±512	16.760±941 (p=0,690)	17.600±565 (p=0,310)	20.360±898 (p=0,05*)	0,01***
( $\Sigma/mm^3$ )	Betina	17.960±344	17.560±542 (p=0,310)	17.480±652 (p=0,222)	19.460±140 (p=0,03*)	0,03***

\*p < 0,05 lebih tinggi dari kontrol, berbeda bermakna

\*\*\*p < 0,05 ada perbedaan antar kelompok

#### 5.5.3.1 Hemoglobin

Nilai rata-rata Hb kelompok tikus jantan yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, tetapi tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ), seperti terlihat pada tabel 5.8.

Pada kelompok tikus betina, terdapat sedikit kecenderungan semakin besar dosis ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. semakin tinggi kadar hemoglobin, akan tetapi tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol (tabel 5.9.)

#### 5.5.3.2 Leukosit

##### Tikus jantan:

Terdapat sedikit kecenderungan semakin besar dosis ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. semakin tinggi kadar leukositnya. Nilai rata-rata leukosit kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol *H. sabdariffa* L. dosis tertinggi 5 g/kg BB lebih tinggi dibandingkan kelompok 1,25 g/kg BB, 2,5 g/kgBB dan kontrol (Tabel 5.8). Terdapat perbedaan secara bermakna nilai leukosit antar kelompok ( $p < 0,05$ ). Tikus yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. kelompok 5

g/kg BB mempunyai nilai leukosit lebih tinggi dibandingkan kontrol dan secara statistik berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ).

### Tikus Betina:

Nilai rata-rata leukosit kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis tertinggi 5 g/kg BB lebih tinggi dibandingkan kelompok 1,25 g/kg BB, 2,5 g/kgBB dan kontrol (Tabel 5.8.). Terdapat perbedaan secara bermakna nilai leukosit antar kelompok ( $p < 0,05$ ). Tikus yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. kelompok 5 g/kg BB mempunyai nilai leukosit lebih tinggi dibandingkan kontrol dan secara statistik berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.3.3 Kimia Darah

Hasil pemeriksaan kimia darah tikus jantan dan betina dapat dilihat pada tabel 5.9.

Tabel 5.9. Pengaruh Berbagai Dosis Ekstrak Etanol *H. sabdariffa* L. ( $x \pm SD$ ) terhadap Kimia Darah Tikus Jantan dan Betina

Parameter	jenis kelamin	kontrol (K)	ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L.			p antar kelompok
			dosis 1,25g/kg	dosis 2,5g/kg	dosis 5 g/kg	
SGOT (U/L)	Jantan	73,17±7,93	76,72±4,31 (p=0,548)	76,67±2,77 (p=0,69)	76,91±5,08 (p=0,69)	0,648
	Betina	72,27±5,67	77,86±4,44 (p=1,00)	76,09±4,22 (p=0,564)	75,39±4,62 (p=0,69)	0,730
SGPT (U/L)	Jantan	31,91±7,92	31,06±0,77 (p=0,222)	30,88±9,65 (p=0,342)	29,39±5,82 (p=0,347)	0,586
	Betina	30,39±3,52	30,27±2,87 (p=0,324)	29,22±4,95 (p=0,352)	28,69±0,88 (p=0,365)	0,815
Ureum (mg%)	Jantan	21,93±2,57	21,86±0,62 (p=0,222)	20,99±2,62 (p=0,346)	22,11±1,22 (p=0,62)	0,796
	Betina	21,63±1,05	21,72±1,8 (p=0,222)	21,13±1,37 (p=0,421)	21,82±3,94 (p=0,387)	0,936
Kreatinin (mg%)	Jantan	0,43±0,10	0,43±0,10 (p=0,222)	0,43±0,03 (p=0,222)	0,43±0,02 (p=0,256)	0,997
	Betina	0,47±0,11	0,46±0,10 (p=0,222)	0,45±0,04 (0,356)	0,44±0,03 (p=0,326)	0,656

SGOT, SGPT, Ureum dan Kreatinin baik pada tikus jantan dan betina tidak berbeda secara bermakna ( $p > 0,05$ ) baik antar kelompok, maupun antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol.

**Tikus Jantan:**

Nilai rata-rata SGOT kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol, tapi tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ). Tidak terdapat perbedaan nilai SGOT antar kelompok (Tabel 5.9.).

Nilai rata-rata SGPT kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, tetapi tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ). Terdapat sedikit kecenderungan semakin besar dosis ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. semakin rendah kadar SGPT. Tidak ada perbedaan bermakna nilai SGPT antar kelompok ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.9.)

Nilai rata-rata ureum kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 5 g/kg BB lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol, tetapi tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ). Tidak ada perbedaan bermakna nilai ureum antar kelompok (Tabel 5.9.).

Tidak terdapat perbedaan nilai rata-rata kreatinin baik pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. maupun kelompok kontrol dengan  $p > 0,05$  (Tabel 5.9.).

Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* SGOT, SGPT, Ureum, kreatinin tidak berbeda secara signifikan pada tikus jantan antar kelompok perlakuan baik kelompok kontrol, 5 g/kgBB, 2,5 g/kgBB, 1,25 g/kgBB tanpa dipengaruhi berat badan (tabel 5.9.).

**Tikus Betina:**

Nilai rata-rata SGOT kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol, akan tetapi tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ). Tidak terdapat perbedaan nilai SGOT antar kelompok (Tabel 5.9.).

Nilai rata-rata SGPT kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, tetapi tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ). Terdapat sedikit kecenderungan semakin besar dosis ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. semakin rendah kadar SGPT tetapi tidak berbeda bermakna (Tabel 5.9.).

Tidak terdapat perbedaan nilai rata-rata ureum antar kelompok perlakuan pada tikus betina ( $p > 0,05$ ). Tidak ada perbedaan bermakna nilai ureum pada kelompok tikus yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dibandingkan kelompok kontrol ( $p > 0,05$ ).

Nilai rata-rata kreatinin kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol, tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ). (Tabel 5.9.).

#### 5.5.3.4 Berat Organ

Dilakukan penimbangan berat organ hati, ginjal, paru, limpa, jantung, otak, usus pada tikus jantan dan betina baik pada kelompok kontrol, 1,25 g/kgBB, 2,5 g/kgBB, dan 5 g/kgBB, dapat dilihat pada tabel 5.10.

Tabel 5.10. Berat Organ Dalam (per 100 g BB) Tikus Jantan dan Betina ( $\bar{x} \pm SD$ )

Organ	jenis kelamin	kontrol (K)	Kelompok perlakuan dosis			p antar kelompok
			1,25g/kg	2,5g/kg	5 g/kg	
Hati	Jantan	5,06±0,80	4,60±0,61 (p=0,548)	4,56±0,54 (p=0,310)	5,06±0,78 (p=1,000)	0,514
	Betina	4,86±0,44	4,13±1,02 (p=0,151)	3,84±0,44 (p=0,32)	4,19±0,79 (p=0,95)	0,103
Ginjal	Jantan	1,25±0,16	1,29±0,26 (p=0,690)	1,20±0,15 (p=0,548)	1,26±0,20 (p=0,841)	0,832
	Betina	1,11±0,05	1,11±0,11 (p=0,841)	1,05±0,06 (p=0,095)	1,16±0,13 (p=0,548)	0,272
Paru	Jantan	1,32±0,15	1,25±0,10 (p=0,421)	1,31±0,11 (p=1,000)	1,18±0,10 (p=0,151)	0,168
	Betina	1,23±0,04	1,21±0,27 (p=0,690)	1,18±0,14 (p=0,411)	1,24±0,07 (p=0,841)	0,785
Limpa	Jantan	0,47±0,06	0,41±0,04 (p=0,095)	0,47±0,12 (p=0,690)	0,45±0,08 (p=0,841)	0,590
	Betina	0,48±0,06	0,41±0,08 (p=0,151)	0,35±0,02** (p=0,005)**	0,48±0,13 (p=0,841)	0,062
Jantung	Jantan	0,55±0,04	0,58±0,10 (p=0,841)	0,56±0,04 (p=1,000)	0,50±0,05 (p=0,310)	0,798
	Betina	0,62±0,08	0,54±0,17 (p=0,421)	0,47±0,04** (p=0,05)**	0,62±0,10 (p=0,841)	0,095
Otak	Jantan	1,56±0,04	1,52±0,10 (p=0,690)	1,58±0,08 (p=0,841)	1,53±0,06 (p=0,690)	0,814
	Betina	1,49±0,17	1,44±0,10 (p=0,310)	1,47±0,08 (p=0,548)	1,57±0,07 (p=0,421)	0,190
Usus	Jantan	10,52±1,90	10,21±0,74 (p=1,00)	9,51±1,02 (p=0,421)	12,01±2,22 (p=0,310)	0,224
	Betina	11,20±0,68	10,38±2,20 (p=0,690)	8,50±0,60** (p=0,05)**	11,20±1,93 (p=1,00)	0,041*

\* $p < 0,05$  lebih tinggi dari kontrol

\*\* $p < 0,05$  lebih rendah dari kontrol

\*\*\* $p < 0,05$  ada perbedaan antar kelompok



**Tikus Jantan:**

Pada tabel 5.10. terlihat bahwa berat rata-rata hati pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 1,25 g/kg BB dan 2,5 g/kgBB lebih ringan daripada kelompok kontrol, kecuali pada kelompok 5 g/kg BB berat hati sama dengan kontrol, tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Berat rata-rata ginjal pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB lebih ringan daripada kelompok 5 g/kgBB dan 1,25 g/kgBB serta kontrol. Tidak ada perbedaan berat ginjal antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata paru pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 5 g/kgBB lebih ringan dengan kelompok 2,5 g/kgBB, 1,25 g/kgBB dan kontrol. Tidak ada perbedaan berat paru-paru antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ). (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata limpa pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB sama dengan kelompok kontrol. Berat rata-rata limpa pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 1,25 g/kgBB lebih ringan dengan kelompok 2,5 g/kgBB, 5 g/kgBB dan kontrol. Tidak ada perbedaan berat limpa antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

Terdapat kecenderungan penurunan berat rata-rata jantung pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Semakin meningkat dosis, terjadi penurunan berat organ jantung, tetapi tidak berbeda bermakna dibandingkan kontrol ( $p > 0,05$ ). Tidak ada perbedaan berat jantung antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata otak pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB lebih berat daripada kelompok dosis 1,25 g/kgBB, dan 5 g/kgBB dan kontrol, tetapi tidak berbeda bermakna. Tidak ada perbedaan berat otak antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata usus pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 5 g/kgBB lebih berat daripada kelompok 1,25

g/kgBB, dan 2,5 g/kgBB dan kontrol. Tidak ada perbedaan berat limpa antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

#### **Tikus Betina:**

Berat rata-rata hati pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih ringan daripada kelompok kontrol. Berat rata-rata hati pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB lebih ringan dibandingkan dengan kelompok 5 g/kgBB. Tidak ada perbedaan berat hati antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata ginjal pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 1,25 g/kgBB sama dengan kelompok kontrol. Berat rata-rata ginjal pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB lebih ringan daripada kelompok 5 g/kgBB dan 1,25 g/kgBB serta kontrol (Tabel 5.11). Tidak ada perbedaan berat ginjal antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata paru pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB lebih ringan dengan kelompok 5 g/kgBB, 1,25 g/kgBB dan kontrol (Tabel 5.13.). Tidak ada perbedaan berat paru antar kelompok maupun antara kelompok perlakuan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata limpa pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 5 g/kgBB sama dengan kelompok kontrol. Berat rata-rata limpa pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB lebih ringan daripada kelompok kontrol, berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ).

Berat rata-rata jantung pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB lebih ringan daripada kelompok kontrol dan secara statistik berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata otak pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 1,25 g/kgBB lebih ringan daripada kelompok dosis 5 g/kgBB, dan 2,5 g/kgBB dan kontrol. Berat rata-rata otak pada kelompok

tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 5 g/kgBB paling berat daripada kelompok lainnya, dan tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ). (Tabel 5.10.).

Berat rata-rata usus pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 5 g/kgBB sama dengan kelompok kontrol. Berat rata-rata usus pada kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB lebih ringan daripada kelompok kontrol dan berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ) (Tabel 5.10.).

#### **5.5.3.5 Pengamatan Organ secara Makroskopis**

Pada kelompok kontrol, pengamatan secara makroskopis tidak menunjukkan kelainan ukuran dan bentuk, serta kekenyalannya normal.

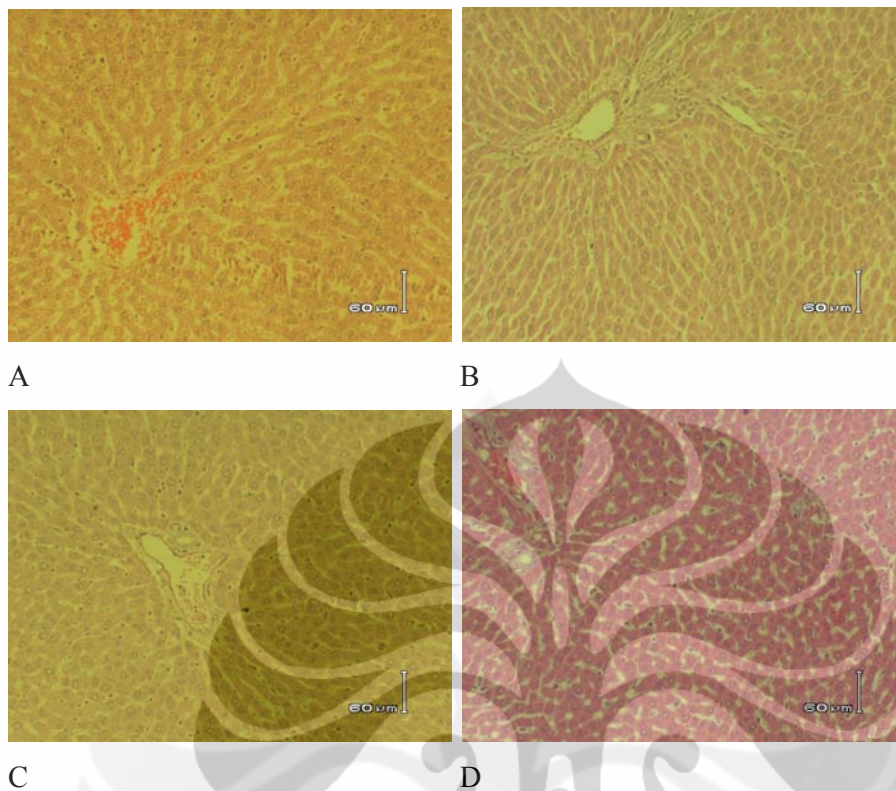
Pada kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 1,25 g/kgBB tidak menunjukkan kelainan dan sebagian besar organ tikus jantan maupun betina sedikit lebih kecil daripada kontrol.

Pada kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 g/kgBB tidak menunjukkan kelainan kecuali limpa, jantung dan usus pada tikus betina sedikit lebih kecil daripada kontrol.

Pada kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 5 g/kgBB tidak menunjukkan kelainan, sebagian besar organ pada tikus jantan sedikit lebih kecil daripada kontrol, sedangkan pada tikus betina sebagian besar organ sama dibandingkan kontrol kecuali hati sedikit lebih kecil.

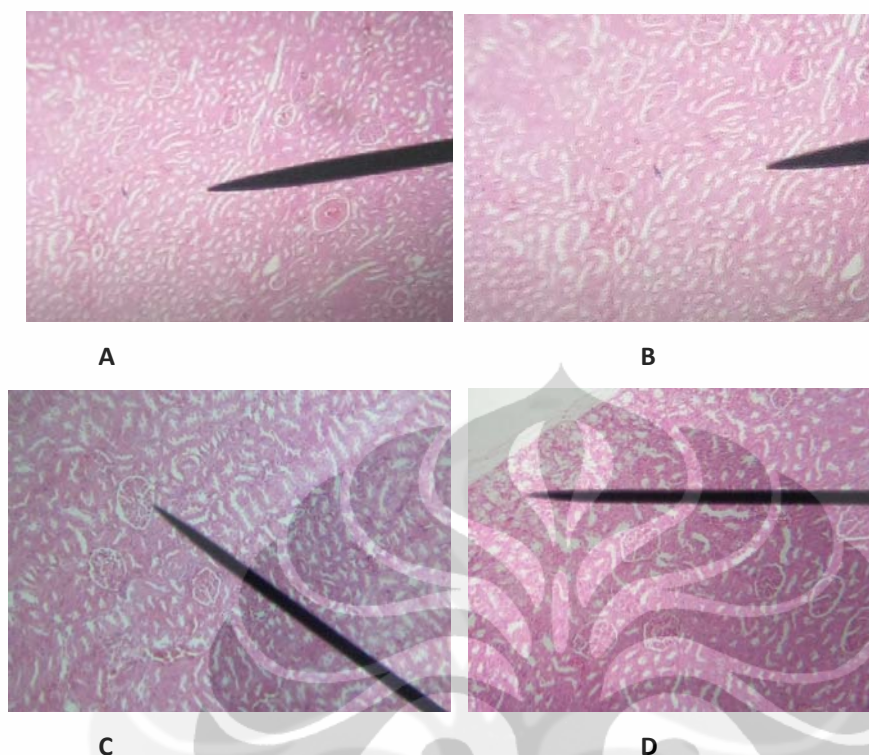
#### **5.5.3.6 Pemeriksaan Organ secara Mikroskopis**

Pada pemeriksaan histopatologi yang dilakukan hampir sebagian besar tikus tidak ditemukan kelainan spesifik khususnya pada organ hati dan ginjal. Hampir semua organ hati tikus pada semua kelompok menunjukkan tidak ada kelainan spesifik, kecuali seekor tikus kelompok dosis 2,5 g/ kg BB terdapat dilatasi sinusoid dan dua tikus pada kelompok kontrol mengalami sedikit dilatasi sinusoid., tetapi masih dalam batas normal. Hasil pengamatan histopatologi organ hati tikus *Sprague-Dawley* jantan dan betina terlihat pada gambar 5.7. menunjukkan tidak ada kelainan spesifik.



Gambar 5.7. Gambaran Mikroskopis Organ Hati Tikus Jantan dan Betina. A). kelompok kontrol; B). kelompok 1,25 g/kgBB; C). kelompok 2,5 g/kgBB; D) kelompok 5 g/kgBB. Semua organ hati tampak normal, tidak ada kelainan spesifik.

Sebagian besar ginjal tikus pada semua kelompok dosis baik dosis 1,25 g/kgBB, kelompok dosis 2,5 g/kgBB, kelompok dosis 5 g/kg BB serta kelompok kontrol tidak ditemukan kelainan spesifik. Hanya ada beberapa tikus ditemukan dilatasi tubulus dan sedikit nekrosis tubulus di bagian korteks, dan masih dalam batas normal. Keadaan ini tidak hanya ditemukan pada kelompok perlakuan, tetapi juga ditemukan pada kelompok kontrol. Hasil pengamatan histopatologi organ ginjal tikus *Sprague-Dawley* jantan dan betina terlihat pada gambar 5.8.



Gambar 5.8. Gambaran Mikroskopis Organ Ginjal Tikus Jantan dan Betina; A). kelompok Kontrol terlihat sel tubulus normal; B). Kelompok 1,25 g/kgBB terlihat sel tubulus normal, C).Kelompok 2,5 g/kg BB terlihat glomerulus normal; D). Kelompok 5 g/kgBB terlihat sedikit dilatasi tubulus pada daerah korteks, tetapi masih dalam batas normal .

Dengan demikian, hipotesis ke-5 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. tidak toksik terhadap organ vital tikus dalam jangka waktu panjang. Nilai NOEL (*No Observed Effect Level*) adalah 1,25 g/kg BB.

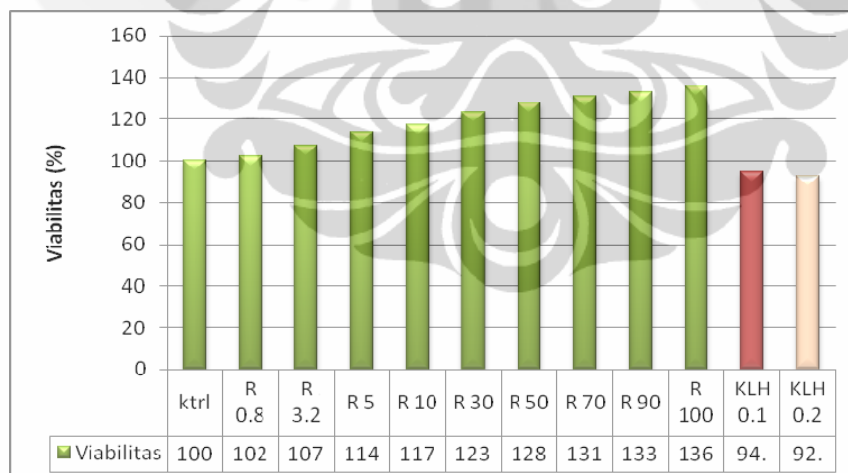
### 5.6 Uji Sitotoksisitas Terhadap Sel Epitel dan Sel Fibroblast

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui sitotoksisitas dari ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap sel epitel dan fibroblast. Efek ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap sel epitel dan fibroblast ditentukan berdasarkan uji MTT dan dinyatakan dalam persentase viabilitas sel terhadap kontrol. Dari masing-masing kelompok, diambil rata-rata nilai absorbansi (OD) dan dihitung *standar deviasi* dalam kelompok konsentrasi yang sama. Lalu nilai absorbansi tersebut dinyatakan ke dalam persentase terhadap kelompok kontrol sebagai viabilitas sel. Nilai absorbansi dan viabilitas sel epitel dapat dilihat pada tabel 5.11. dan gambar 5.9.

Tabel 5.11. Viabilitas (%) Sel Epitel Setelah Dipapar Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* Selama 24 jam

Kelompok	Rerata OD (x)±SD	Persentase Viabilitas (%)	p dibanding ktr (-)	p dibanding KLH 0,1	p dibanding KLH 0,2
Kontrol negatif (tanpa perlakuan)	0,974 ± 0,002	100%	-	0,000*	0,000*
Kontrol positif					
KLH 0.1%	0,924 ± 0,002	94,87%	0.000*	-	0,000*
KLH 0.2%	0,904 ± 0,001	92,79%	0.000*	0,000*	-
Ekstrak etanol					
0,8%	0,995 ± 0,001	102,10%	0.000*	0,000*	0,000*
3,2%	1,044 ± 0,001	107,13%	0.000*	0,000*	0,000*
5,0%	1,108 ± 0,002	113,75%	0.000*	0,000*	0,000*
10%	1,142 ± 0,001	117,16%	0.000*	0,000*	0,000*
30%	1,202 ± 0,001	123,38%	0.000*	0,000*	0,000*
50%	1,244 ± 0,003	127,67%	0.000*	0,000*	0,000*
70%	1,274 ± 0,002	130,76%	0.000*	0,000*	0,000*
90%	1,294 ± 0,002	132,79%	0.000*	0,000*	0,000*
100%	1,324 ± 0,002	135,86%	0.000*	0,000*	0,000*

\*p < 0.05 berbeda bermakna



Gambar 5.9. Grafik Viabilitas (%) Sel Epitel Setelah Dipaparkan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L. selama 24 jam

R = *H. sabdariffa* 0,8% -100%      Ktrl = kontrol sel      KLH= klorheksidin

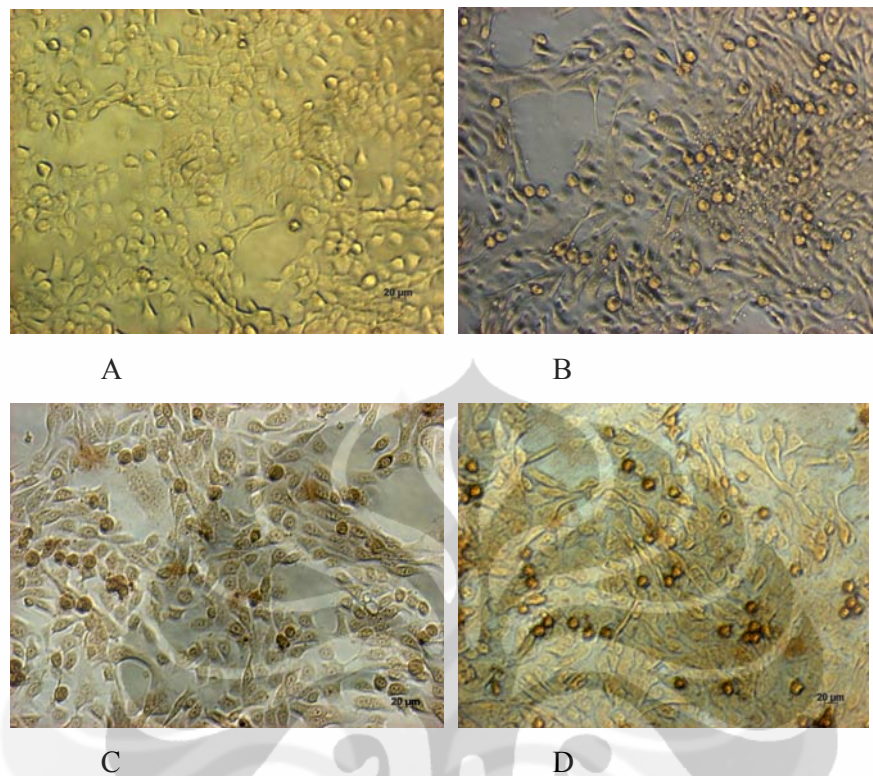
Pada tabel 5.11. tampak viabilitas sel epitel kelompok perlakuan meningkat sesuai dengan peningkatan konsentrasi pada 0,8% (102,10%), 3,2% (107,13%),



5,0% (113,75%), 10% (117,16%), 30% (123,38%), 50% (127,67%), 70% (130,76%), 90% (132,79%), 100% (135,86%) dan viabilitasnya lebih tinggi dari kelompok kontrol (100%), sedangkan viabilitas pada kelompok kontrol positif yaitu klorheksidin 0,1% (94,87%) dan 0,2% (92,79%) memiliki viabilitas lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol (100%). Semua kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. memiliki viabilitas lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% dan 0,2%.

Secara statistik perbandingan kelompok kontrol dengan kelompok kontrol positif (klorheksidin 0,1% dan 0,2%) maupun kelompok perlakuan (ekstrak etanol kelopak *H. sabdariffa* L. (dari 0,2% sampai 100%) mempunyai perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) (Tabel 5.11.).

Terlihat bahwa persentase viabilitas sel tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi 100% dan menurun seiring dengan menurunnya konsentrasi yang diberikan. Sedangkan persentase viabilitas terendah terdapat pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% (94,87%) dan 0,2% (92,79%). Di bawah ini terdapat gambaran sel epitel kontrol, setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 50% dan 100% serta kontrol klorheksidin yang terlihat dengan mikroskop *inverted* Zeiss (gambar 5.10. A-D).



Gambar 5.10. Gambaran Mikroskopis Sel Epitel: A). kelompok kontrol; B). setelah perlakuan klorheksidin (pembesaran 100x); C) setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* 50% (pembesaran 100x); D). setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* 100% (pembesaran 100x).

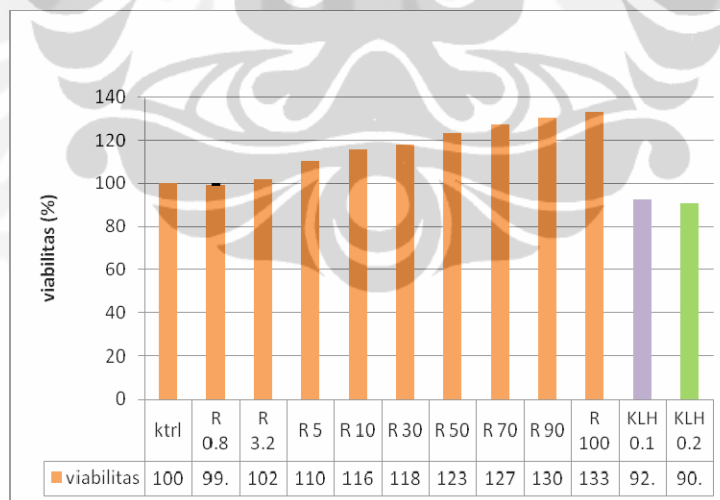
Sitotoksitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap sel fibroblast ditentukan berdasarkan viabilitas sel dalam persentase terhadap kontrol. Nilai absorbansi dan viabilitas sel fibroblast dapat dilihat pada tabel 5.12. dan gambar 5.11. Gambar sel fibroblast kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 5.12.



Tabel 5.12. Viabilitas (%) Sel Fibroblast Setelah Dipapar Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L. (24 jam)

Kelompok	Rerata OD (x) ±SD	Viabilitas (%)	p dibanding ktr(-)	p dibanding KLH 0,1%	p dibanding KLH0,2%
Kontrol neg (tanpa perlakuan)	0,771 ± 0.002	100%	-	0,000*	0,000*
Kontrol positif					
KLH 0.1%	0,713 ± 0.003	92,52%	0.000*	-	0,000*
KLH 0.2%	0,696 ± 0.002	90,36%	0.000*	0,000*	-
Ekstrak etanol					
0,8%	0,766 ± 0.010	99,43%	0.000*	0,000*	0,000*
3,2%	0,788 ± 0.002	102,24%	0.000*	0,000*	0,000*
5,0%	0,850 ± 0.005	110,32%	0.000*	0,000*	0,000*
10%	0,891 ± 0.000	115,63%	0.000*	0,000*	0,000*
30%	0,910 ± 0.003	118,05%	0.000*	0,000*	0,000*
50%	0,951 ± 0.006	123,39%	0.000*	0,000*	0,000*
70%	0,981 ± 0.001	127,28%	0.000*	0,000*	0,000*
90%	1,006 ± 0.002	130,49%	0.000*	0,000*	0,000*
100%	1,027 ± 0.001	133,20%	0.000*	0,000*	0,000*

\*p < 0.05 berbeda bermakna

Gambar 5.11. Grafik Viabilitas (%) Sel Fibroblast Setelah Dipaparkan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

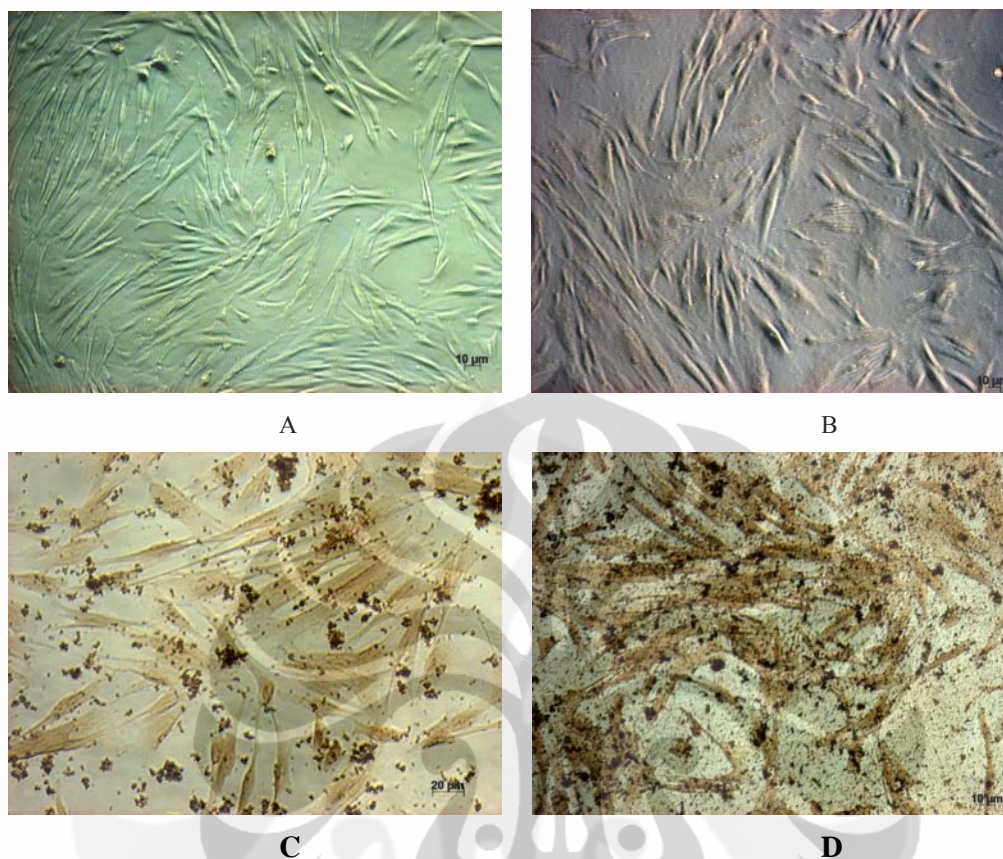
Ktrl : kontrol, R : Ekstrak *H. sabdariffa*, KLH : klorheksidin

Pada tabel 5.12. tampak viabilitas sel primer fibroblast kelompok perlakuan 3,2% (102,24%), 5,0% (113,75%), 10% (110,32%), 30% (118,05%), 50% (123,39%), 70% (127,28%), 90% (130,49%), 100% (133,20%) lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (100%), sedangkan pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% (92,52%) dan 0,2% (90,36%) dan kelompok perlakuan 0,8% (99,43%) memiliki viabilitas lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol (100%).

Semua kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. memiliki viabilitas lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% dan 0,2% dan berbeda bermakna ( $p < 0,05$ )

Secara statistik perbandingan kelompok kontrol dengan kelompok kontrol positif (klorheksidin 0,1% dan 0,2%) maupun kelompok perlakuan (ekstrak etanol kelopak *H. sabdariffa* L. dari 0,2% sampai 100%) mempunyai perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) (Tabel 5.12.).

Terlihat bahwa persentase viabilitas sel tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi 100% dan menurun seiring dengan menurunnya konsentrasi yang diberikan. Sedangkan persentase viabilitas terendah terdapat pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% (92,52%) dan 0,2% (90,36%). Di bawah ini terdapat gambaran sel epitel kontrol, setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 50% dan 100% serta kontrol klorheksidin yang terlihat dengan mikroskop *inverted Zeiss* (gambar 5.12. A-D).



Gambar 5.12. Gambaran Mikroskopis Sel Fibroblast; A). kelompok kontrol (pembesaran 100x); B). Perlakuan klorheksidin (pembesaran 100x); C). setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 50% (pembesaran 200x); D). setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.100% (pembesaran 200x).

Dengan demikian, hipotesis ke-6 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. aman dan tidak toksik terhadap sel epitel dan fibroblast.

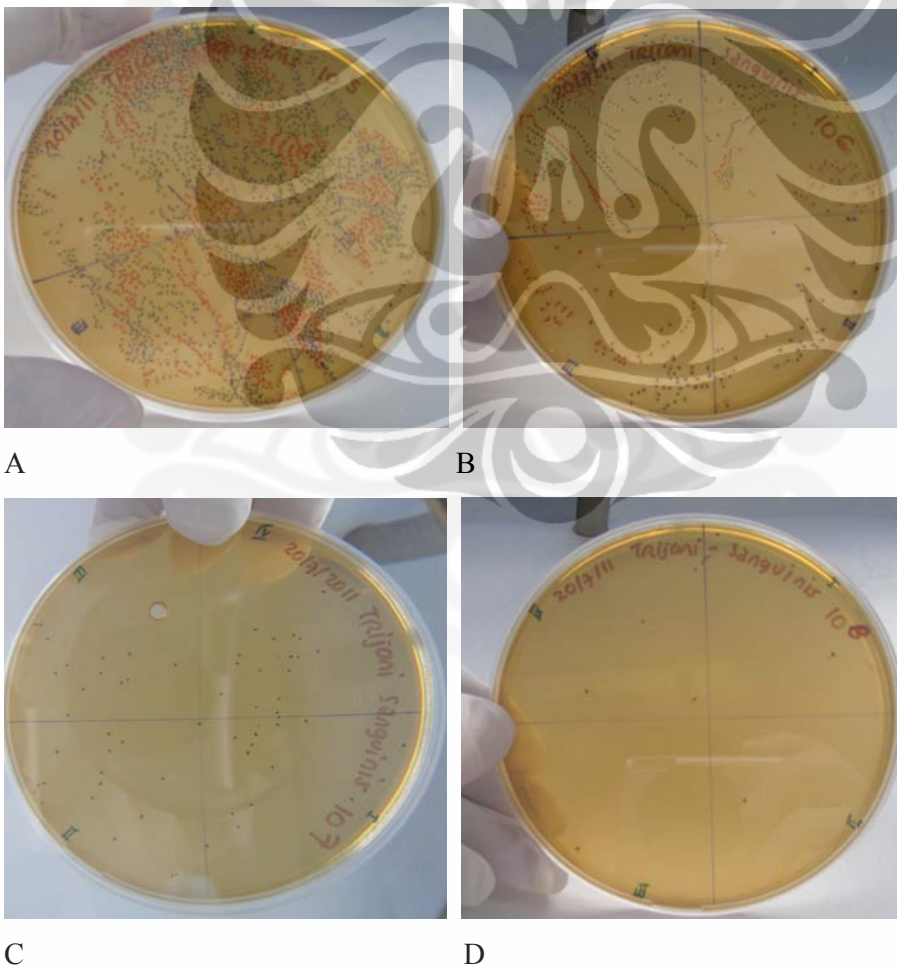
### 5.7 Uji Biofilm *Streptococcus sanguinis*

Pada penelitian orientasi pertama, dilakukan pengenceran suspensi bakteri *S. sanguinis* dari pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$ . Penghitungan dari hasil biakan bakteri dengan pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-5}$  sulit dihitung karena koloni terlalu padat. Pada hasil biakan bakteri dengan pengenceran  $10^{-6}$  kepadatan koloni sudah berkurang dan mudah dihitung. Namun pada hasil biakan bakteri dengan pengenceran  $10^{-7}$  hingga  $10^{-8}$ , koloni tumbuh sangat sedikit. Dengan demikian pada penelitian ini ditentukan pengenceran bakteri  $10^{-6}$  karena memenuhi kriteria yaitu tidak terlalu padat

dan dapat dihitung. Rata-rata jumlah koloni pada pengenceran  $10^{-6}$  adalah 636 CFU/mL. Hasil ini dapat dilihat pada tabel 5.13. dan gambar 5.13.

Tabel 5.13. Jumlah Koloni *Streptococcus sanguinis* (CFU/mL) pada Serial Dilution dari  $10^{-1}$  sampai  $10^{-8}$

Pengenceran <i>S.sanguinis</i>	Jumlah Koloni (CFU/10 $\mu$ l)
$10^{-1}$ (100 $\mu$ l larutan induk bakteri + 900 $\mu$ l BHI)	> 7000
$10^{-2}$ (100 $\mu$ l larutan bakteri $10^{-1}$ + 900 $\mu$ l BHI)	> 5000
$10^{-3}$ (100 $\mu$ l larutan bakteri $10^{-2}$ + 900 $\mu$ l BHI)	> 5000
$10^{-4}$ (100 $\mu$ l larutan bakteri $10^{-3}$ + 900 $\mu$ l BHI)	> 3000
$10^{-5}$ (100 $\mu$ l larutan bakteri $10^{-4}$ + 900 $\mu$ l BHI)	> 2000
$10^{-6}$ (100 $\mu$ l larutan bakteri $10^{-5}$ + 900 $\mu$ l BHI)	636
$10^{-7}$ (100 $\mu$ l larutan bakteri $10^{-6}$ + 900 $\mu$ l BHI)	61
$10^{-8}$ (100 $\mu$ l larutan bakteri $10^{-7}$ + 900 $\mu$ l BHI)	8



Gambar 5.13. Hasil Biakan *S.sanguinis* pada Pengenceran  $10^{-5}$  (A),  $10^{-6}$  (B),  $10^{-7}$  (C),  $10^{-8}$  (D)

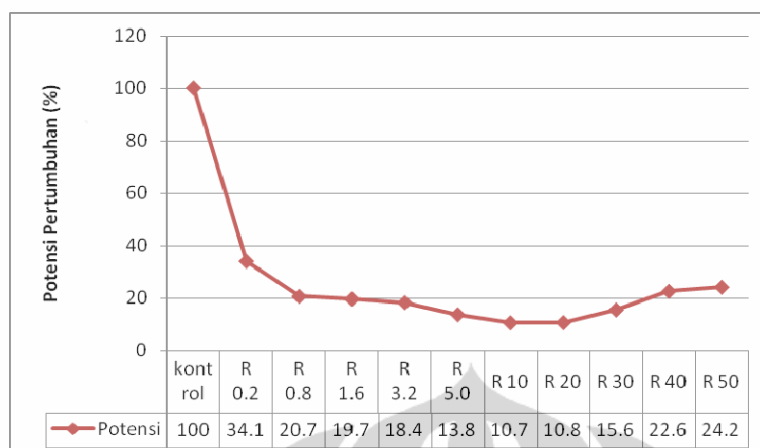
Pada penelitian uji antibakteri berbagai ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. (konsentrasi 0.2% hingga 50%) terhadap potensi pertumbuhan *biofilm* *S. sanguinis* fase *adherence* (20 jam) dan fase maturasi (24 jam) dengan menggunakan uji *crystal violet*, dimana uji ini dilakukan secara *triplo* dan diulang sebanyak tiga kali. Nilai *optical density* (OD) yang didapatkan (dibaca pada panjang gelombang 490 nm) kemudian dirata-rata. Hasil pada *biofilm* 20 jam dan 24 jam dengan berbagai ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dipapar selama 1 jam dengan uji *crystal violet* dapat dilihat pada tabel 5.14. dan gambar 5.14. serta tabel 5.15. dan gambar 5.15. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri yang dipapar oleh ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dari konsentrasi 0.2% hingga 50% menunjukkan penurunan jumlah bakteri.

Tabel 5.14. Potensi Pertumbuhan *Biofilm S. sanguinis* dalam Fase *Adherence* (20jam) Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Kelompok	Rerata OD (x) ±SD	viabilitas (%)	p dibanding Ktr (-)	p dibanding KLH 0,1	p dibanding KLH 0,2
Kontrol neg (tanpa perlakuan)	0.155 ± 0.001	100%	-	0,000*	0,000*
Kontrol positif					
KLH 0.1%	0.031 ± 0.002	20.47%	0.000*	-	0,000*
KLH 0.2%	0.016 ± 0.001	10.66%	0.000*	0,000*	-
Ekstrak etanol					
0.2%	0.053 ± 0.002	34.14%	0.000*	0,000*	0,000*
0.8%	0.032 ± 0.002	20.75%	0.000*	0,824	0,000*
1.6%	0.030 ± 0.000	19.75%	0.000*	0,226	0,000*
3.2%	0.028 ± 0.003	18.39%	0.000*	0,040*	0,000*
5.0%	0.021 ± 0.001	13.81%	0.000*	0,000*	0,000*
10%	0.016 ± 0.000	10.73%	0.000*	0,000*	0,482
20%	0.016 ± 0.000	10.80%	0.000*	0,000*	0,494
30%	0.024 ± 0.002	15.60%	0.000*	0,001*	0,000*
40%	0.035 ± 0.003	22.69%	0.000*	0,099	0,000*
50%	0.037 ± 0.004	24.26%	0.000*	0,021*	0,000*

\*p < 0.05 tidak berbeda bermakna



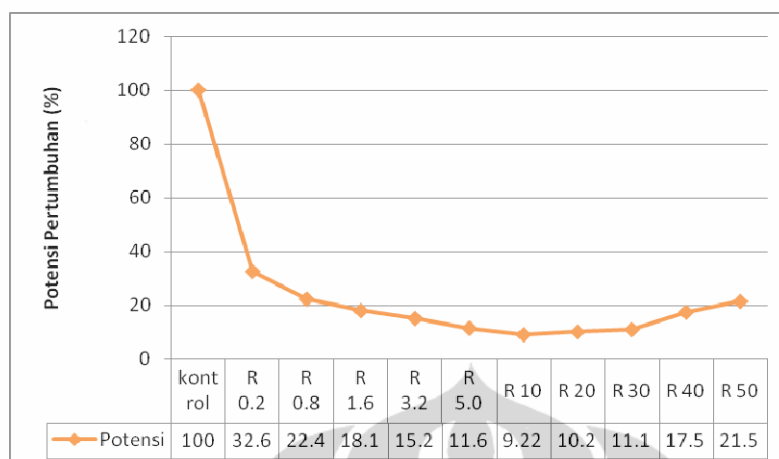


Gambar 5.14. Potensi Pertumbuhan *S. sanguinis* dalam Fase *Adherence Biofilm* (20 jam)

Tabel 5.15. Potensi Pertumbuhan *Biofilm S. sanguinis* Pada Fase Maturasi (24 jam) Pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan.

Kelompok	Rerata OD (x) ±SD	Viabilitas (%)	p dibanding Ktr(-)	p dibanding KLH 0,1	p dibanding KLH 0,2
Kontrol negatif (tanpa perlakuan)	0.077 ± 0.001	100%	-	0,000*	0,000*
Kontrol positif					
KLH 0.1%	0.014 ± 0.003	18.47%	0.000*	-	0,000*
KLH 0.2%	0.007 ± 0.000	9.26%	0.000*	0,000*	-
Ekstrak etanol					
0.2%	0.025 ± 0.001	32.66%	0.000*	0,000*	0,000*
0.8%	0.017 ± 0.001	22.44%	0.000*	0,024*	0,000*
1.6%	0.014 ± 0.000	18.12%	0.000*	0,262	0,000*
3.2%	0.011 ± 0.009	15.25%	0.000*	0,226	0,000*
5.0%	0.008 ± 0.001	11.62%	0.000*	0,002*	0,002*
10%	0.007 ± 0.000	9.22%	0.000*	0,000*	0,755
20%	0.007 ± 0.000	10.23%	0.000*	0,000*	0,000*
30%	0.008 ± 0.000	11.12%	0.000*	0,000*	0,000*
40%	0.013 ± 0.002	17.55%	0.000*	0,246	0,000*
50%	0.016 ± 0.001	21.58%	0.000*	0,226	0,000*

\*p < 0.05 berbeda bermakna



Gambar 5.15. Potensi Pertumbuhan *Biofilm S. sanguinis* Fase Maturasi (24 jam)

Hasil rerata nilai *Optical Density* (OD), potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam biofilm 20 jam dan 24 jam dan hasil uji statistik *one way anova* baik pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. selama 60 menit dengan uji *crystal violet* dapat dilihat pada tabel 5.14. dan 5.15. Pada tabel 5.14. menunjukkan bahwa potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam biofilm 20 jam terhadap kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif. Nilai rerata OD pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0.1% (20.47%) setara dengan kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 0.8% (20.75%) dengan tidak ada perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ). Nilai rerata OD kelompok klorheksidin 0.2% (10.66%) setara dengan kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. konsentrasi 10% (10.73%) dengan tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ), dan 20% (10.80%) dengan tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Pada tabel 5.15. menunjukkan bahwa potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam biofilm 24 jam pada kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif. Nilai rerata OD pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0.1% (18.47%) setara dengan kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 1.6% (18.12%) dengan tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ). Nilai rerata OD kelompok klorheksidin 0.2% (9.26%) setara dengan kelompok ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. konsentrasi ekstrak etanol kelopak

bunga *H. sabdariffa* L. konsentrasi 10% (9.22%) dengan tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Dengan demikian, hipotesis ke-7 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* pada *biofilm* dan efektivitas antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* yang setara dengan klorheksidin pada uji *biofilm*.





## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Dasar Pemikiran Penyusunan Desain Penelitian

*Hibiscus sabdariffa* L. merupakan tanaman obat yang telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia karena terbukti memiliki berbagai macam khasiat, salah satunya adalah digunakan sebagai antibakteri. Adapun kelebihan dari tanaman obat adalah dalam suatu ramuan yang mengandung berbagai komponen yang berbeda yang memiliki lebih dari satu efek farmakologi, meskipun dalam penggunaannya tanaman obat ini masih memiliki kelemahan antara lain bahan baku yang belum terstandar dan belum dilakukan uji klinik. Untuk mengatasi kekurangan tersebut maka kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. perlu diteliti dan dikembangkan menjadi tanaman obat terstandar dengan beberapa alasan.

Alasan pertama bahwa secara empiris kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dilaporkan berkhasiat sebagai antiinflamasi<sup>46</sup>, antiseptik, antibakteri<sup>39</sup>, astringent, analgetik, memperlancar peristaltik usus<sup>47,48</sup> dan antipiretik<sup>49,50</sup>. Tanaman tersebut diindikasikan untuk pengobatan abses<sup>48</sup>, anti kanker<sup>46,51</sup>, anti tumor, anti leukemik, *immune-modulating*<sup>51</sup>, batuk, demam, menurunkan tekanan darah, mengurangi kekentalan atau viskositas darah<sup>48,51</sup>, neurosis, antioksidan tinggi<sup>46,48,50</sup>, peluruh kencing (diuretik), merangsang keluarnya empedu dari hati (*chloretic*), menurunkan kadar kolesterol<sup>49,51,53</sup>, asam urat, sitrat, tartrat, trigliserida dalam urine, anti kejang (spasmodik).<sup>54</sup>

Alasan kedua adalah pengembangan tanaman obat ini suatu usaha mendukung Kebijakan Pemerintah Indonesia. Indonesia memiliki keanekaragaman hayati terbesar kedua setelah Brazil. Di Indonesia penggunaan tanaman obat sebagai pengobatan alternatif sudah dilakukan dan dipercaya oleh masyarakat secara turun temurun. Indonesia adalah negara yang secara geografis terdiri dari banyak pulau. Keadaan tersebut menjadi kendala dalam pemerataan pelayanan kesehatan bagi seluruh rakyat, oleh karena itu penggunaan bahan alam atau tanaman obat untuk mengatasi masalah kesehatan di masyarakat perlu dilestarikan dan tentu saja harus didukung oleh bukti-bukti ilmiah yang memadai. Dengan demikian perlu diketahui karakteristik tanaman dan standarisasi dari proses penyediaan bahan baku. Pada penelitian ini telah

dilakukan penyediaan bahan uji yaitu ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L., penelitian mengenai zat yang terkandung di dalam ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L., penelitian khasiat antibakteri terhadap *Streptococcus sanguinis* yaitu bakteri penyebab gingivitis, penelitian keamanan meliputi toksisitas akut, subkronis dan sitotoksitas, dan pengaruh ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap potensi pertumbuhan bakteri penyebab gingivitis dalam model *biofilm*.

## 6.2 Uji Skrining Fitokimia

Uji skrining Fitokimia dilakukan pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Ekstrak etanol dapat diperoleh melalui beberapa tehnik yaitu maserasi, digesti, perkolasi, dan sokletasi.<sup>41,120</sup> Pada penelitian ini digunakan tehnik maserasi dengan alasan cara pengerjaan dan metode yang digunakan sederhana, mudah diusahakan dibandingkan dengan tehnik ekstraksi lainnya, dan merupakan metode yang banyak digunakan untuk pembuatan ekstrak yang diambil dari simplisia bunga atau daun.<sup>41,120</sup> Beberapa pelarut yang digunakan dapat berupa metanol 70%, etanol 70%, aquadest steril dan lain-lain. Adapun pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol 70 % karena etanol merupakan pelarut yang sangat polar, lebih aman dibandingkan metano,<sup>41</sup> sedangkan pelarut lain seperti aquadest steril dapat menarik senyawa kimia akan tetapi tidak stabil dan mudah terkontaminasi oleh bakteri lain dan jamur. Konsentrasi pelarut juga mempengaruhi hasil ekstrak, semakin tinggi kadar pelarut maka semakin besar komponen yang diambil.<sup>41</sup>

Uji Skrining Fitokimia yang dilakukan pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. diperoleh hasil bahwa ekstrak ini mengandung metabolit sekunder seperti saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, dan glikosida (tabel 5.1). Kandungan senyawa yang bersifat antibakteri pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. diketahui berdasarkan uji fitokimia kualitatif. Dalam penelitian ini uji dilakukan dengan melihat perubahan warna yang terjadi setelah penambahan bahan kimia tertentu pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Metode uji fitokimia ini cukup sederhana dan hasilnya akurat.<sup>41</sup> Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung senyawa fenol yang terdiri dari flavonoid, tannin, dan saponin.<sup>112</sup>

Adapun alasan melakukan skrining fitokimia adalah untuk mengetahui kandungan kimia dari obat herbal yang diperiksa. Obat herbal atau obat bahan alam mengandung banyak kandungan kimia, dan umumnya tidak diketahui zat aktif yang berperan dalam menimbulkan efek terapi atau efek samping. Kandungan obat herbal ditentukan oleh berbagai faktor seperti letak geografis atau tempat tumbuh tanaman, iklim, cara pembudidayaan, cara dan waktu panen, cara perlakuan pasaca panen (pengeringan dan penyimpanan),<sup>44</sup> dengan demikian hasil yang diperoleh dalam penelitian ini lebih menguatkan potensi senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sebagai obat antibakteri.

Aktivitas antibakteri pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. didapatkan pada kandungan fenolik yang terdiri dari flavonoid, tanin, antosianin, dan saponin. Senyawa flavonoid merupakan senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa ini menghasilkan zat warna merah, ungu, biru dan zat warna kuning dalam tumbuhan. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri.<sup>40,55</sup> Flavonoid dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme karena mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen.<sup>40,55</sup> Flavonoid dalam merusak sel bakteri memanfaatkan perbedaan kepolaran antara lipid penyusun sel bakteri dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid.<sup>40,55</sup>

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bersifat desinfektan yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang dapat menyebabkan aktifitas metabolisme sel bakteri berhenti, karena semua aktifitas metabolisme sel bakteri dikatalisi oleh suatu enzim yang merupakan protein.<sup>160</sup> Berhentinya aktifitas metabolisme ini mengakibatkan kematian sel bakteri. Flavonoid juga bersifat bakteriostatik yang bekerja melalui penghambatan sintesis dinding sel bakteri.<sup>160</sup>

Saponin mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, yang mana saponin memiliki molekul yang dapat menarik air atau hidrofilik dan molekul yang dapat melarutkan lemak atau lipofilik sehingga menurunkan tegangan permukaan sel yang akhirnya menyebabkan kehancuran bakteri.<sup>161</sup>

Senyawa fenol meliputi beragam senyawa yang bersal dari tumbuhan dan memiliki struktur kimia yang sama, yaitu mempunyai cincin aromatik dengan satu atau dua gugus hidroksil (OH). Senyawa ini peka terhadap oksidasi enzim dan cepat membentuk kompleks dengan protein. Senyawa fenol juga memiliki aktivitas antiseptik yaitu dapat berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada konsentrasi rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan lemah dan segera mengalami peruraian, kemudian fenol bekerja dengan merusak membran sitoplasma dan dapat menyebabkan kebocoran inti sel. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, zat tersebut berkoagulasi dengan protein seluler sehingga membran sitoplasma mengalami lisis.<sup>148</sup>

Senyawa tannin adalah senyawa fenolik, yang mengandung gugus hidroksil memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Mekanisme tannin sama dengan flavonoid yaitu merusak sel bakteri dengan memanfaatkan perbedaan kepolaran lipid penyusun sel bakteri dan gugus alkohol pada rantai polifenol dari tannin. Tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri, akibatnya sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan

Data yang diperoleh dari penelitian ini mendukung hipotesis pertama yang menyatakan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung golongan senyawa kimia yang bersifat antibakteri diterima.

### **6.3 Parameter Standar Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.**

Pengembangan tanaman obat meliputi bentuk sediaan tanaman obat, uji praklinik, dan uji klinik, serta bahan baku dan produk jadinya telah distandarisasi.<sup>41</sup> Dalam pengembangan *H. sabdariffa* L. sebagai tanaman obat digunakan bentuk ekstrak yang mengandung seluruh komponen berkhasiat dari *H. sabdariffa* L.<sup>41</sup>

Parameter standar adalah suatu prosedur yang harus dilakukan terhadap semua bahan herbal. Standarisasi dilakukan terhadap ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan tujuan untuk memperoleh nilai yang menunjukkan karakteristik ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dan merupakan salah satu syarat untuk menuju obat herbal terstandar. Sejauh ini belum dilakukan standarisasi terhadap ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.<sup>42</sup>

Dalam pengembangan obat tradisional menjadi obat herbal terstandar dan fitofarmaka, maka simplisia harus memenuhi persyaratan mutu agar dapat menimbulkan efek yang berkhasiat dan aman. Persyaratan mutu harus diupayakan dari hulu ke hilir, mulai dari budidaya, prosedur pemanenan dan pengolahan paska panen, pembuatan bahan baku, serta pembuatan sediaan. Parameter standar mutu simplisia antara lain meliputi kadar air, kadar abu, berat jenis, rendemen, cemaran logam berat, cemaran aflatoksin, cemaran jamur atau kapang, cemaran residu pestisida.<sup>41</sup> Parameter standar mutu ekstrak selain mencakup hal tersebut juga dilakukan parameter konsistensi ekstrak. Sedangkan parameter untuk sediaan termasuk diantaranya waktu hancur, kadar bahan tambahan (pengawet, pewarna, pemanis, bahan kimia obat), kadar etanol dan stabilitas.<sup>43</sup>

Selama ini belum ada parameter standar untuk ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L., sehingga hasil penelitian ini dapat dijadikan standar *H. sabdariffa* L. yang merupakan standar awal dalam pemanfaatan *H. sabdariffa* L. Dengan demikian hipotesis kedua yang mengatakan bahwa parameter standar *H. sabdariffa* L. dapat ditetapkan diterima.

#### **6.4 Uji Kadar Hambat Minimal (KHM), Kadar Bunuh Minimal (KBM) dan Zona Hambat Ekstrak Etanol Kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis*.**

Pada konsentrasi rendah, antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan pada konsentrasi tinggi dapat membunuh bakteri tertentu.<sup>88</sup> Bahan dengan konsentrasi tinggi bersifat bakterisid yaitu memiliki daya membunuh bakteri, sedangkan bahan dengan konsentrasi rendah bersifat bakteriostatik yaitu memiliki daya menghambat bakteri.<sup>88</sup>

Dalam penelitian ini dilakukan tes sensitivitas bakteri untuk menguji efek antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis*. Tes sensitivitas yang digunakan adalah metode dilusi dan difusi agar.<sup>122,124</sup> Metode dilusi agar digunakan untuk mengetahui besarnya efek bakteriostatik yang optimal atau nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis*, merupakan konsentrasi minimal yang dapat menghambat

pertumbuhan *S. sanguinis* serta efek bakterisid yang optimal atau nilai Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis*, yaitu konsentrasi minimal yang dapat membunuh *S. sanguinis*.<sup>124</sup> Nilai KHM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. diketahui dengan menganalisis nilai kekeruhan secara langsung. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat ditentukan bahwa kadar hambat minimum (KHM) ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berada pada kisaran konsentrasi 0,78%, seperti tampak pada tabel 5.3.

Penentuan efek bakterisid yang optimal atau nilai Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* dilakukan dengan menganalisis konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak terdapat koloni *S. sanguinis* yang hidup pada medium agar metode dilusi agar.<sup>124</sup> Dalam penelitian ini pemaparan *S. sanguinis* dengan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. pada konsentrasi 0.78% tidak ditemukan pertumbuhan bakteri. Pada hasil penelitian ini sebanding dengan klorheksidin 0,1% dan 0.2% dalam kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan *S. sanguinis*.

Penelitian dengan metode difusi agar bertujuan untuk menganalisis daya antibakteri bahan uji dengan mengukur besar zona hambat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* pada berbagai tingkat konsentrasi. Penentuan zona hambat digunakan untuk mengetahui seberapa besar daya antibakteri yang dimiliki oleh suatu bahan uji, dalam hal ini diamati dan diukur dari daerah jernih yang terdapat disekeliling bahan uji, yang dinyatakan dalam mm.

Berdasarkan hasil zona hambat yang terbentuk, maka ditentukan resistensi dari bakteri uji terhadap ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dan efektivitas dari bahan uji. Pada penelitian ini terlihat bahwa semua konsentrasi ekstrak etanol *H. sabdariffa* L. menghasilkan pembentukan zona hambat. Hasil ini mengindikasikan bahwa *S. sanguinis* tidak bersifat resisten dan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terbukti memiliki efek dalam menghambat pertumbuhan *S. sanguinis* (Tabel 5.5.).

Peningkatan diameter zona hambat sesuai dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dipaparkan.<sup>124</sup> Pada kontrol negatif berupa *blank disk* yang tidak diberi perlakuan terlihat tidak terdapat zona

hambat, sedangkan pada kelompok yang diberi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terbentuk zona hambat pada semua konsentrasi ekstrak yang diuji. Hasil ini menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap pertumbuhan *S. sanguinis*. Pada kontrol positif terlihat zona hambat yang terbentuk pada klorheksidin 0,1% (10,33 mm), yang setara dengan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 6,25% (10,166 mm). Zona hambat yang terbentuk pada pemberian klorheksidin 0,2% (12,66 mm) setara dengan pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 12,5%, (12,5 mm). Dari hasil analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Yuniarti (2011) mengenai zona hambat *curcuma xanthorrhiza* terhadap *S. sanguinis* menunjukkan zona hambat terkecil terjadi pada *curcuma xanthorrhiza* dengan konsentrasi 0,5% (6,08 mm) dan terbesar pada konsentrasi 25% (8,79 mm), akan tetapi kedua konsentrasi tersebut lebih kecil dibandingkan klorheksidin 0,1% (16,2 mm) dan klorheksidin 0,2% (18,4 mm). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. konsentrasi 6,25% mempunyai daya hambat terhadap *S. sanguinis* lebih besar daripada *curcuma xanthorrhiza* 25%.<sup>159</sup>

Klorheksidin merupakan salah satu bahan antibakteri kimiawi sintetis yang efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif<sup>85</sup>, sehingga klorheksidin dijadikan antibakteri standar yang digunakan di masyarakat untuk mencegah pembentukan plak gigi.<sup>147</sup> Hambatan pertumbuhan bakteri pada plak oleh klorheksidin dihubungkan dengan sifat klorheksidin yang dapat membentuk ikatan dengan komponen-komponen perubahan sel bakteri pada plak di permukaan gigi. Ikatan tersebut terjadi 15-30 detik setelah kumur dan lebih dari 1/3 bagian klorheksidin diserap dan melekat, namun jumlah perlekatan sebanding dengan konsentrasinya<sup>146</sup>. Kation aktif yang terkandung dalam klorheksidin berinteraksi dengan gugus-gugus yang bermuatan negatif pada dinding sel bakteri dan juga presipitasi protein plasma sel bakteri yang akhirnya menyebabkan kematian bakteri. Penelitian menunjukkan bahwa perlekatan akan terjadi sampai 24 jam yang berarti sebanding dengan efek bakteriostatik terhadap sel bakteri. Akibatnya terjadinya ikatan-ikatan tersebut maka pembentukan plak dapat dihambat.<sup>147</sup>

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka hipotesis ketiga yang menyatakan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai nilai KHM dan KBM yang sama yaitu pada konsentrasi 0,78% dan mempunyai zona hambat yang setara dengan klorheksidin dapat diterima.

### 6.5 Uji Keamanan Ekstrak Etanol Kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Untuk menguji keamanan suatu bahan coba dilakukan dengan uji toksikologi. Ada 2 macam uji toksikologi yaitu 1). uji toksikologi yang dirancang untuk mengevaluasi keseluruhan efek umum suatu senyawa pada hewan coba seperti uji toksisitas akut, uji toksisitas sub kronis, dan uji toksisitas kronis; 2). Uji toksikologi yang dirancang untuk mengevaluasi secara rinci tipe toksisitas spesifik seperti uji toksisitas teratogenik atau mutagenik.<sup>44</sup> Untuk melihat keamanan penggunaan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. pada penelitian ini dilakukan uji toksisitas akut dan uji toksisitas subkronis dan uji toksisitas khusus.

Dalam penelitian ini dilakukan uji toksisitas akut dengan alasan bahwa setiap obat baru atau bahan obat baru harus dilakukan uji untuk mengetahui keamanan penggunaan dosis tunggal suatu obat atau bahan obat yang dipakai sebagai obat. Uji ini meliputi penentuan dosis letal median (LD<sub>50</sub>), pengamatan perubahan berat badan dan gejala-gejala toksik seperti tingkah laku abnormal, tremor, salivasi, lakrimasi dan perubahan warna pada bulu, pada keadaan normal bulu tampak putih mengkilap, dan pada keadaan toksik tampak kekuningan dan kecoklatan.<sup>43</sup>

Di dalam ilmu toksikologi, LD<sub>50</sub> dari suatu bahan atau obat adalah suatu dosis yang diperlukan untuk membunuh setengah dari sekelompok hewan coba, sekaligus dapat diamati gejala toksik serta perubahan patologis hewan yang bersangkutan. Uji ini digunakan sebagai suatu indikator umum tingkat toksisitas akut suatu bahan atau obat. LD<sub>50</sub> pertama kali diperkenalkan sebagai suatu indeks oleh Trevan pada tahun 1927.

Uji toksisitas pada penelitian ini menggunakan dosis terbesar, yaitu 15 g/kgBB, kemudian setelah diberikan cekok dosis tunggal, dilakukan pengamatan sampai hari ke-14, apakah ada tikus yang mati atau tidak. Untuk keperluan ini maka disiapkan 5 ekor tikus jantan atau betina. Pengujian dilakukan dengan pencekakan sebanyak 15 g/kgBB, dimasukkan dalam rongga mulut menggunakan alat pencekok atau sonde lambung. Pada hari ke-14 setelah pencekokkan tunggal, diperiksa ternyata



tidak ditemukan tikus mati, maka uji dinyatakan selesai dan aman, sehingga dinyatakan bahwa LD<sub>50</sub> pada uji toksisitas akut ini adalah lebih dari 15 g/kgBB. Hasil ini sesuai dengan laporan Lu (2000),<sup>128</sup> yang menyatakan bahwa bahan material dikatakan aman jika LD<sub>50</sub> > 15 g/kgBB.

Selain penentuan LD<sub>50</sub> uji toksisitas akut juga dievaluasi perubahan berat badan hewan coba dan uji skrining farmakologi. Lu (2006) yang mengatakan bahwa berat badan dapat mempengaruhi tingkat manifestasi toksik suatu bahan obat.<sup>128</sup> Dalam penelitian ini pengamatan berat badan dilakukan pada tikus jantan selama 14 hari, dan ternyata semua tikus jantan mengalami kenaikan berat badan. Pada pengamatan uji skrining farmakologi, untuk melihat kemungkinan gejala toksik, terungkap bahwa respon sistem saraf pusat (motorik, tremor, pineal, fleksi) dan respon sistem saraf otonom (piloreksi, salivasi, lakrimasi, diare) tidak terpengaruh. Diperoleh data bahwa pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. menyebabkan diare pada hari-1 dan kembali normal setelah 24 jam pengamatan. Dari data di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat dikatakan aman dari aspek toksisitas akut.

Hasil penelitian terhadap uji toksisitas akut ini mendukung hipotesis ke empat yang menyatakan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. adalah tanaman herbal yang aman, dan tidak toksik terhadap organ vital tikus, dan didapatkan LD<sub>50</sub> adalah lebih dari 15 gr/kg BB.

## 6.6 Uji Toksisitas Subkronis

Alasan dilakukan uji toksisitas subkronis pada penelitian ini adalah untuk mengetahui efek obat jika diberikan dalam waktu yang lama (*long term use*) dan secara berulang-ulang. Pada penelitian ini bahan uji diberikan sekali sehari selama 30 hari. Dengan melakukan uji toksisitas subkronis, maka dapat diketahui efek akumulasi obat, toleransi, metabolisme dan kelainan yang ditimbulkan pada organ atau sistem organ tertentu. Efek toksik akumulatif dapat terjadi karena obat terfiksasi secara kuat pada jaringan atau bila proses metabolik dan ekskresi tidak menghilangkan obat dari tubuh dalam waktu yang memadai. Selain itu ada kemungkinan obat dan metabolitnya telah hilang dari dalam tubuh tetapi efek masing-masing obat pada jaringan masih tetap ada.<sup>149,150</sup> Berdasarkan hal tersebut di atas, maka pada uji toksisitas subkronis ini

dievaluasi perilaku, perubahan bobot badan, pemeriksaan urin, karakteristik dan biokimia darah, dan pemeriksaan histopatologi.<sup>126</sup>

Dari data berat badan, berat organ, tingkah laku, pemeriksaan laboratorium darah dan histopatologi hewan coba yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam 3 tingkatan dosis dibandingkan kontrol dibahas hal-hal sebagai berikut:

Perubahan berat badan merupakan indikator yang sederhana namun sensitif untuk mengetahui efek toksik suatu bahan coba. Selama 30 hari tidak ditemukan adanya perbedaan berat badan antara kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis kecil (1,25 mg/kgBB), sedang (2,5 mg/kgBB) dan tinggi (5 mg/kgBB) dengan kontrol baik pada tikus jantan maupun betina, sehingga dapat disimpulkan sementara ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak menyebabkan perubahan berat badan yang mungkin disebabkan oleh pola makan atau sebab lainnya.

Tidak ditemukan perubahan tingkah laku (tikus tampak aktif pergerakan motoriknya, tidak ditemukan kelainan gejala klinik maupun kematian pada kelompok tikus jantan maupun betina yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam 3 tingkatan dosis maupun kontrol.

Ginjal dan hati merupakan organ tempat dimetabolismenya bahan atau obat yang masuk ke dalam tubuh. Oleh karena itu, dalam penelitian ini diteliti pengaruh bahan coba terhadap fungsi ginjal dan hati.

Pada tikus jantan yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak terdapat perbedaan bermakna pada nilai SGOT dan SGPT. Pada tikus betina, nilai SGOT pada kelompok yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 2,5 mg/kgBB lebih tinggi dibandingkan kelompok yang mendapat dosis rendah (1,25 mg/kgBB) dan dosis tinggi (5 mg/kgBB), tetapi nilai ini tidak berbeda bermakna dibandingkan kelompok kontrol. Pola yang sama terlihat untuk SGPT sehingga disimpulkan bahwa perbedaan ini bersifat kebetulan dan tidak terkait dengan dosis.

Pada tikus jantan dan betina yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 2,5 mg/kgBB terlihat nilai ureum yang lebih rendah dari kelompok lain dan kontrol. Tapi nilai rendah ini tidak bermakna apa-apa karena gangguan fungsi ginjal terlihat sebagai peningkatan ureum, bukan penurunan. Nilai kreatinin tidak

mengalami perbedaan setelah pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis tinggi (bermakna pada tikus betina), namun nilai ini masih berada dalam rentang normal. Atas dasar hasil ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak mengganggu fungsi ginjal.

Meningkatnya kadar Hb pada tikus yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. pada tikus jantan (dosis rendah, sedang dan tinggi) dan tikus betina (dosis rendah, sedang dan tinggi) menunjukkan kemungkinan pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. secara subkronik (1 bulan) menstimulasi sistem enteropoetik. Meningkatnya hitung leukosit pada tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. (dosis tinggi) selama 3 bulan baik pada tikus jantan dan betina mungkin disebabkan peningkatan produksi leukosit yang diperlukan untuk respon sistem pertahanan tubuh seluler (leukosit) terhadap infeksi, namun jika melihat nilai hitung leukosit yang dianggap masih dalam rentang normal untuk tikus laboratorium disini, maka kemungkinan menurunnya produksi leukosit bukan disebabkan oleh efek toksik bahan uji.

Berat semua organ dalam pada tikus jantan tidak berbeda bermakna antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Berat organ hati dan usus pada kelompok tikus jantan yang mendapatkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 1,25 mg/kg BB lebih ringan daripada kontrol. Pada dosis menengah berat organ yang lebih ringan meliputi hati, ginjal, limpa, jantung, usus, namun pada dosis tertinggi (5 mg/kgBB), berat organ-organ tersebut (kecuali paru) sama dengan kontrol. Berkurangnya berat organ-organ dalam ini tidak diketahui penyebabnya dan hal ini terjadi secara kebetulan.

Pemeriksaan histopatologis yang dilakukan pada hewan coba pada organ hati dan ginjal sebagian besar tidak ditemukan kelainan spesifik. Hampir semua organ hati pada semua kelompok menunjukkan tidak ada kelainan spesifik, kecuali 1 tikus kelompok dosis 2,5 g/kgBB terdapat dilatasi sinusoid dan 2 tikus pada kelompok kontrol mengalami dilatasi sinusoid. Hal ini berarti bahwa kelainan ini terjadi secara kebetulan. Pemeriksaan pada organ ginjal terdapat beberapa tikus ditemukan dilatasi tubulus dan nekrosis tubulus, dan ini ditemukan pada setiap kelompok perlakuan dan kontrol. Hal ini berarti kelainan ini terjadi secara kebetulan karena tidak terlihat perubahan yang konsisten berdasarkan peningkatan dosis.

Hasil penelitian terhadap uji toksisitas subkronis ini mendukung hipotesis ke enam yang menyatakan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. adalah tanaman herbal yang aman, dan tidak toksik untuk pemakaian jangka panjang, dan ditetapkan nilai NOEL (*No Observed Effect Level*) adalah 1,25 g/kg BB.

---

### 6.7 Uji Toksisitas Khusus (Sitotoksisitas) Sel Epitel dan Sel Fibroblast

Pentingnya dilakukan uji toksisitas khusus ini karena nantinya bahan uji akan dipakai peroral. Semua obat peroral tentu akan berkontak dengan mukosa dan gingiva. Oleh karena itu epitel dan fibroblast dipakai sebagai target sel uji. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa viabilitas kedua sel tidak menurun setelah dipapar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L., walaupun demikian karena paparan hanya 24 jam maka perlu diteliti lebih lanjut jika waktu kontak ditingkatkan.

Pemilihan epitel dan fibroblast sebagai sel uji dikarenakan kedua sel ini menyusun jaringan kulit manusia yaitu sel keratinosit yang telah mengalami immortalisasi, sehingga mudah untuk dikultur dan dapat melakukan pembelahan tanpa batas, namun tidak bersifat membentuk tumor.<sup>157</sup> Akan tetapi penggunaan galur sel ini mungkin tidak mencerminkan mekanisme utuh dari jaringan karena galur sel ini memiliki pola kromosom aneuploid dan dapat memperbanyak diri dengan cepat serta masa hidup yang tidak terbatas.<sup>157</sup>

Sitotoksisitas umumnya ditandai dengan adanya beberapa gejala misalnya penurunan dari proliferasi sel, viabilitas sel, sintesis asam nukleat dan protein. Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk bertahan hidup. Viabilitas sel menunjukkan adanya respons sel jangka pendek, seperti perubahan permeabilitas membran atau gangguan pada jalur metabolisme tertentu. Oleh karena itu, viabilitas sel dapat dijadikan indikator sitotoksisitas suatu bahan yang dipaparkan pada sel tersebut.<sup>138</sup>

Pada awalnya uji toksisitas khusus ini ditujukan untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub> akan tetapi pada penelitian tidak didapatkan IC<sub>50</sub>, karena viabilitas epitel dan fibroblast setelah dipaparkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. konsentrasi 0,8-100% lebih tinggi daripada kontrol. Penelitian ini menunjukkan

bahwa pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak menghambat pertumbuhan sel tetapi justru meningkatkan pertumbuhan sel. Dari gambaran mikroskopis nampak morfologi sama tetapi ukuran lebih lebar. Karena itu perlu penelitian lebih lanjut apakah sel tersebut masih menyerupai sel epitel dan fibroblast sebelumnya atau apakah epitel dan fibroblast telah mengalami perubahan bentuk.

Hasil viabilitas dari sel epitel maupun fibroblast yang dipaparkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. selama 24 jam memberikan hasil viabilitas sel lebih tinggi dari kontrol. Asumsi waktu 24 jam sudah cukup membuktikan bahwa bahan tersebut aman, mengingat tahapan penelitian selanjutnya yang direncanakan berupa formulasi bentuk sediaan di dalam rongga mulut misalnya berupa obat kumur dengan penggunaan berkumur selama 30 detik, atau berupa gel yang diaplikasikan selama 1 menit.

Penggunaan etanol 70% sebagai pelarut pada metode maserasi sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengganggu hanya sedikit yang tercampur ke dalam cairan pengestraksi sehingga menghasilkan ekstrak dengan kadar total fenolik dan flavonoid tertinggi dibandingkan dengan bahan pelarut lain dalam metode maserasi.<sup>57</sup> Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. kemudian dilarutkan dengan DMSO 1% dan dibuat berbagai macam konsentrasi dan dipaparkan ke dalam sel epitel dan sel primer Fibroblast yang telah dikultur sebelumnya untuk menguji viabilitas sel tersebut. DMSO merupakan pelarut yang umumnya digunakan untuk penelitian biomedik, dan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan DMSO 1% tidak membunuh *S. sanguinis*. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Hwang (2006) dan Vasude dkk (2009).

Nilai absorbansi (OD) didapat melalui pembacaan *microplate reader*. Uji statistik *one way anova* digunakan untuk membandingkan antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif dengan masing-masing perlakuan. Uji *one way anova* dipilih karena terdapat lebih dari 2 kelompok data viabilitas sel. Kelompok tersebut adalah kelompok negatif, kelompok positif dan kelompok perlakuan. Uji tersebut menunjukkan adanya perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ) pada viabilitas kelompok kontrol dengan kelompok kontrol positif (klorheksidin 0,1% dan 0,2%) maupun dengan kelompok perlakuan.

### 6.8 Uji *Biofilm* dengan *Crystal Violet*

*Streptococcus sanguinis* merupakan spesies yang banyak ditemukan pada awal pembentukan *biofilm*.<sup>76,81</sup> Pada penelitian ini efek ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap potensi pertumbuhan *S. sanguinis* diuji pada fase pembentukan *biofilm* 20 dan 24 jam karena pada fase tersebut pertumbuhan bakteri mulai melambat (20 jam) dan akhirnya berhenti (24 jam).<sup>80</sup> Pada fase 20 jam, penurunan potensi pertumbuhan *biofilm S. sanguinis* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 0,2-20%. Pada fase 24 jam, penurunan potensi pertumbuhan *biofilm S. sanguinis* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 0,2% sampai 10%. Namun pada kelompok bakteri yang dipaparkan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 30-50% pada fase 20 jam dan konsentrasi 20-50% pada fase 24 jam, potensi pertumbuhan *biofilm S. sanguinis* meningkat dan hal ini belum dapat dipastikan penyebabnya, sehingga perlu penelitian lebih lanjut.

Beberapa kemungkinan yang menyebabkan hasil seperti diuraikan di atas adalah : 1). Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai efek ganda yaitu pada konsentrasi rendah bersifat antibakteri tetapi pada konsentrasi tinggi dapat meningkatkan potensi pertumbuhan *biofilm Streptococcus sanguinis*. Adanya penurunan potensi pertumbuhan bakteri serupa dengan penelitian Fidini (2011) pada uji *biofilm* ekstrak temulawak terhadap potensi pertumbuhan *S. sanguinis* menunjukkan hasil bahwa semakin tinggi konsentrasi temulawak maka pertumbuhan bakteri semakin menurun. Hasil penelitian ini menunjukkan pada fase 20 jam, penurunan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* seiring peningkatan konsentrasi ekstrak etanol temulawak 0,5-5%, dan pada fase 24 jam, penurunan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol temulawak 0,5-10%, sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi menunjukkan hal yang sebaliknya<sup>163</sup>; 2). Pengukuran potensi pertumbuhan bakteri berdasarkan pada intensitas warna (kolorimetri) seperti halnya spektrofotometri yang digunakan dalam penelitian ini kurang akurat karena ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. pada konsentrasi tinggi memiliki kepekatan warna, sehingga perlu dianalisis efek anti bakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap potensi pertumbuhan *S. sanguinis*

dengan metode lain seperti mengukur bakteri di level DNA menggunakan metode *Polymerase chain reaction* (PCR).

*Streptococcus sanguinis* merupakan salah satu bakteri yang berperan penting dalam proses pembentukan biofilm, dimana *S. sanguinis* berperan sebagai *scaffold* tempat melekatnya mikroorganisme lain dalam rongga mulut yang dapat mengawali timbulnya penyakit periodontal dan dapat menyebabkan *bacterial endocarditis*.<sup>84</sup> *S. sanguinis* yang digunakan dalam penelitian ini diinkubasi selama 48 jam karena merupakan umur pertumbuhan optimal bagi bakteri. Spesimen dibiakkan pada suhu 37°C karena berdasarkan penelitian diketahui suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri anaerob adalah 37°C.

Pada penelitian ini ekstrak kelopak bunga *H. sabdariffa* L. diencerkan dengan DMSO (*dimethyl sulfoxide*) 1%, dimana DMSO merupakan pengencer yang sering digunakan dalam penelitian, dan hasilnya tidak menyebabkan kematian *S. sanguinis*. Hal ini sesuai dengan penelitian Hwang (2006) bahwa pada DMSO 1% tidak membunuh bakteri *Streptococcus sanguinis*.<sup>158</sup> Uji *biofilm* dengan *crystal violet* merupakan suatu *colorimetric assay* yang akan mengukur kuantitas sel berdasarkan intensitas pewarnaan *crystal violet* pada dinding sel bakteri. Peningkatan intensitas warna akan menghasilkan nilai OD yang tinggi dan dapat diinterpretasikan sebagai kuantitas bakteri tinggi, semakin ungu kebiruan warna yang terbentuk maka mengindikasikan semakin tingginya kuantitas *S. sanguinis* yang masih hidup dan mampu melekat pada permukaan biofilm.<sup>150,151</sup>

Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dipaparkan memperlihatkan kecenderungan penurunan perlekatan *S. sanguinis* pada biofilm baik pada fase *adherence* (20 jam) dan fase maturasi (24 jam). Hal ini menunjukkan bahwa efek kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dipengaruhi waktu (*close dependent*). Penurunan kuantitas *S. sanguinis* seiring dengan kenaikan konsentrasi disebabkan adanya aktivitas antibakteri fenol, flavonoid, saponin dan tanin. Membran bakteri yang rusak akan menyebabkan *S. sanguinis* lisis, sehingga jumlah *S. sanguinis* pada biofilm akan berkurang, padahal *S. sanguinis* sebagai *early colonizer* berperan sebagai jembatan antara pelikel dengan bakteri-bakteri yang melekat kemudian, maka dengan lisisnya *S. sanguinis*, perlekatan bakteri *late colonizer* pada pelikel akan terganggu. Hal ini dapat berakibat gagalnya pembentukan *biofilm*.

Adanya beberapa teori mengenai mekanisme terjadinya resistensi *biofilm* terhadap antimikroba. Salah satu penyebab adanya resistensi pada *biofilm* adalah tingkat pertumbuhan yang melambat. Ketika koloni bakteri pada *biofilm* mulai kehabisan nutrisi, maka pertumbuhannya akan mulai melambat. Perlambatan ini berpengaruh terhadap terjadinya resistensinya pada antimikroba. Perlambatan pertumbuhan bakteri dapat diobservasi pada fase maturasi *biofilm*.<sup>79</sup> Dengan demikian *biofilm* yang telah mengalami fase maturasi akan lebih resisten terhadap antimikroba dibandingkan *biofilm* yang belum mengalami maturasi.<sup>79</sup>

Klorheksidin digunakan sebagai kontrol positif karena klorheksidin merupakan *gold standar* dan telah teruji secara klinis.<sup>23</sup> Secara statistik tidak terdapat perbedaan bermakna antara potensi pertumbuhan bakteri yang dipapar klorheksidin 0.1% dan 0.2% dibandingkan dengan paparan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Dalam grafik potensi pertumbuhan *S. sanguinis* pada fase *adherence* *biofilm* (20 jam), potensi pertumbuhan bakteri pada paparan klorheksidin 0.1% setara dengan paparan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 0.8%. Sementara potensi pertumbuhan pada paparan klorheksidin 0.2% setara dengan paparan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 10% dan 20%, yang secara statistik tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Dalam grafik potensi pertumbuhan *S. sanguinis* pada fase maturasi *biofilm* (24 jam), potensi pertumbuhan bakteri pada paparan klorheksidin 0.1% setara dengan paparan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 1.6%. Sementara potensi pertumbuhan *S. sanguinis* pada paparan klorheksidin 0.2% setara paparan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 10%, yang secara statistik dinyatakan sebagai tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ).

Rencana tindak lanjut penelitian selanjutnya adalah membuat bentuk sediaan yang tepat untuk dipergunakan dalam rongga mulut, khususnya untuk terapi gingivitis seperti pembuatan obat kumur antiseptik, dan dilakukan penelitian terhadap jaringan keras gigi seperti kekerasan email mengingat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai pH 5,2. Penelitian selanjutnya diperlukan untuk melihat sifat penyerapan warna ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap jaringan gigi manusia secara *in vitro*, dan perlu dilakukan penelitian mengenai efek ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap penyembuhan gingivitis secara *in vivo* maupun uji klinis. Perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut untuk



menjadikan *H. sabdariffa* L. sebagai fitofarmaka dengan melakukan uji keamanan kronis dan uji klinik tahap 1 dan 2, dan diharapkan setelah didapatkan bentuk sediaan yang baik, bermutu sesuai parameter standar, berkhasiat sebagai antibakteri, maka diharapkan dapat bekerjasama dengan pihak farmasi atau pabrik obat untuk memproduksi bentuk sediaan tersebut sehingga dapat digunakan untuk masyarakat sebagai terapi tambahan gingivitis.

---



## BAB 7

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 SIMPULAN

Setelah melalui rangkaian penelitian, telah dibuktikan bahwa :

- 7.1.1 Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung senyawa fenol, flavonoid, tanin dan saponin yang bersifat antibakteri.
- 7.1.2 Nilai parameter Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat ditetapkan yaitu susut pengeringan 27,2%, bobot jenis 0,9036 g/mL, kadar air 8,03% dan kadar abu 8,13%.
- 7.1.3 Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai efek antibakteri terhadap *S. sanguinis* pada konsentrasi 0,78%.
- 7.1.4 Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman dan tidak toksik pada pemakaian jangka pendek berdasarkan uji toksisitas akut dan didapatkan nilai LD<sub>50</sub> adalah > 15 g/kgBB.
- 7.1.5 Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman dan tidak toksik berdasarkan pemakaian jangka panjang berdasarkan uji toksisitas sub kronis, dan didapatkan nilai NOEL (*Non Observed Effect Level*) adalah 1,25 g/kg BB.
- 7.1.6 Berdasarkan uji MTT, ekstrak etanol kelopak bunga *H. Sabdariffa* L. tidak toksik terhadap sel epitel maupun fibroblast.
- 7.1.7 Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *biofilm S. sanguinis*

#### 7.2 SARAN

Dari hasil penelitian ini maka dapat diajukan beberapa saran :

- 7.2.1 Perlu penelitian lebih lanjut mengenai bentuk sediaan yang tepat untuk dipergunakan dalam rongga mulut, khususnya untuk mengobati gingivitis.
- 7.2.2 Perlu penelitian terhadap jaringan keras gigi seperti kekerasan email serta sifat penyerapan warna ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap jaringan keras gigi.

- 7.2.3 Perlu dilakukan penelitian efek ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap penyembuhan gingivitis secara *in vivo*, lalu dilanjutkan pada uji klinis.
- 7.2.4 Perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut untuk menjadikan *H. sabdariffa* L. sebagai fitofarmaka dengan melakukan uji keamanan kronis serta uji klinis.
- 7.2.5 Perlu kerjasama dengan pihak farmasi atau pabrik obat untuk memproduksi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.



## DAFTAR REFERENSI

1. Bergenholtz A. dan Jorkjend L. Some Modern Aspects of Periodontal Disease. *SDS Journal* 1990; 4(2):156-164.
2. American Academy of Periodontology. Position Paper Periodontal Disease of Children and Adolescents. *J Periodontol* 2003; 74 : 1696-1704.
3. Camargo GA, Silveria CE, Fortes TN, Silva A, Silva C. Periodontal Health Status and Prevalence of Root Caries in Brazilian Adults of Aracaju City. *JDOH* 2010; 2(3): 23-26
4. Depkes RI. *Profil Kesehatan Gigi dan Mulut di Indonesia tahun 1990*. Jakarta : Dirjen Yanmed. Depkes. 1992
5. Agniti MD. Epidemiologi dan Etiologi Penyakit Periodontal. *Cermin Dunia Kedokteran* 1991;72: 42-46
6. Profil Kesehatan Indonesia 2001 *Menuju Indonesia Sehat 2010*. Jakarta : Pusat Data Depkes RI. 2002.
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Survei Kesehatan Nasional 2001 Dalam *Laporan SKRT, 2001 : Studi morbiditas dan Disabilitas*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan 2001: 43-52.
8. Prayitno SW. A Comparition of The periodontal Health of Two Groups Indonesian and Characterization of Advanced Periodontal Disease. 1990.
9. Genco RJ, Loe H. The Role of Systemic Conditions and Disorders in Periodontal Disease. *Periodontol* 2000. 1993; 2 : 98-112.
10. Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal Manifestations of Systemic Disease. *Aust Dent J*. 2001; 46 (1) : 2-12.
11. Anonimous. *Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Sudut Pandang Masyarakat Mengenai Status, Cakupan, Ketanggapan dan Sistem Pelayanan Kesehatan*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Depkes RI 2004;3 :18-20.
12. Aninomous. *Profil Kesehatan Gigi dan Mulut di Indonesia pada Pelita VI*. Direktorat Jenderal Pelayanan Medik, Direktorat Kesehatan Gigi. DepKes RI 1999: 18
13. Zhang J, Xuan D, Fan W, Zhang X dkk. Severity and Prevalence of Plague-Induced Gingivitis in the Chinese Population. *Compend Contin Educ Dent*. 2010; 31: 8: 1-8.
14. American Academy of Periodontology. Position Paper Epidemiology of Periodontal Disease. *J Periodontol* 2005;76:1406-1419.
15. Situmorang N. Profil Penyakit Periodontal Penduduk di Dua kecamatan Kota Medan Tahun 2004 Dibandingkan Dengan Kesehatan Mulut tahun 2010 (WHO). *Dentika Dental Journal* 2003; 2(9):71-77.
16. Carranza FA, Rapley JW, Haake SK. Gingival Inflammation. In: *Carranza's Clinical Periodontology*. 9<sup>th</sup> ed. Newman MG, Takei HH, Carranza FA Jr, eds. Philadelphia: Saunders 2002: 263

17. Novaes AB Jr, de Souza SLS, Mario Taba Jr, Grisi MFdM, Suzigan LC, Tunes RS. Control of Gingival Inflammation in A Teenager Population Using Ultrasonic Prophylaxis. *Braz Dent J* 2004; 1 :15.
18. Barnett ML. The Rationale for The Daily Use of An Antimicrobial Mouthrinse. *J Am Dent Assoc* 2006; 137 (supl 3): 16-21.
19. Wu H, Mintz P, Ladha M, Fives-Taylor PM. Isolation and Characterization of Fap1, A Fimbriae-associated Adhesion of *Strep parasanguis* FW213. *Mol Microbiol* 1998;28:487-500.
20. Ge X, Kitten T, Chen Z, Lee SP, Munro CL, Xu P. Identification of *Streptococcus sanguinis* Genes Required for Biofilm Formation and Examination of Their Role in Endocarditis Virulence. *Infect Immun* 2008; 76(6): 2551-9.
21. Slot J dan Taubman MA. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Mosby Yearbook, St. Louis, Philadelphia, Sidney, Toronto. 1992: 363.
22. Idone V, Bendtro S, Gillespie R, Kojac S, Peterson E, Rendi M, Warren W, Michalek S, KrAstel K, Cvitkovitch D, Spatafora G. Effect of an orphan Response Regulator on *Strep* Sucrose-Dependent Adherence and Cariogenic. *Infect Imm* 2003 ; 8(71):4351-60.
23. Marsh PD dan Martin MV. *Oral Microbiology*. 4<sup>th</sup> ed. Edinburgh : Elsevier. 2009: 74-100.
24. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial Mechanism in The Pathogenesis of Destructive Periodontal Disease : A critical Assessment. *J. Period Res* 1991;26:195-212.
25. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. *Microbiology* 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia : JB lippincott.1990: 71-80.
26. Kriswandini IL. Bakteri *Streptococcus sanguis* Sebagai Fasilitator *Streptococcus Mutans* yang Berperan Dalam Pathogenesis Karies Gigi. *Maj. Ked. Gigi (dent J)*. Ed khusus *Timnas IV* 11-13 Agustus 2005: 247-251.
27. Rosan B. Mechanism of Oral Colonization. In : Slots J, Taubman MA. *Contemporary Oral Microbiology and Microbiology*. St. Louis Missouri : Mosby Year Book. 1992: 283-98.
28. Carlen A, Olsson J, Ramberg P. Saliva Mediated Adherence, Aggregation and Prevalence in Dental Plaque of *Strep mutans*, *Strep sanguinis* dan *Actinomyces spp*. In Young and Elderly Humans. *Archs Oral Biol* 1996;41(12):113-40.
29. Nolte AW. *Oral Microbiology with Basic Microbiology and Immunology*. Ed. Ke-4. St. Louis : CV Mosby Company. 1982: 307-308.

30. Perry DA. Plaque Control for the Periodontal Patient. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FAJr, eds. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10<sup>th</sup> ed. St.Louis: Saunders. 2006: 728-48.
31. Perry DA, Schmid MO, Takei HH. Phase I Periodontal Therapy. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FAJr, eds. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10<sup>th</sup> ed. St.Louis: Saunders. 2006: 722-726.
32. Quirynen M, Soers C, Desnyder M, Dekeyser C, Pauwels M, van Steenberghe D. A 0.05% Cetyl Pyridinium Chloride/ 0.05% Chlorhexidine Mouth Rinse During Maintenance Phase After Initial Periodontal Therapy. *J Clin Periodontol* 2005; 32(4): 390–400.
33. Arweiler NB, Netushil L, Reich E. Alcohol-free Mouthrinse Solutions to Reduce Supragingival Plaque Regrowth and Vitality. A controlled Clinical Study. *J Clin Periodontol* 2001; 28 (2) : 168-74.
34. Chaerunissa AY, Surahman E, Imron SS. *Farmasetika Dasar. Konsep Teoritis dan Aplikasi Pembuatan Obat*. Ed. Ke-1. Bandung : Widya padjajaran.2009: 15-19.
35. Tichy J, Novak J. Extraction, Assay, and Analysis of Antimicrobials from Plants with Activity Against Dental Pathogen (Streptococcus sp.). *J Altern Complement Med* 1998; 4 (1):39-45.
36. Kaim JM, Gultz J, Do L, Scherer W. An in Vitro Investigation of The Antimicrobial Activity of An Herbal Mouthrinse. *J Clin Dent* 1998; 9(2):46-8.
37. Zubardiah LMQ. *Efektivitas Ekstrak Daun Lawsonia inermis L. Terhadap Penyembuhan Gingivitis : Kajian Potensi Pemanfaatan Fitofarmaka Indonesia* (disertasi). Jakarta : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2009.
38. Sidik. Perkembangan dan Pemanfaatan Tumbuhan Obat di Indonesia. *Makalah Seminar Pengobatan Tradisional*. Bandung : Fakultas Kedokteran Unpad. 1998.
39. Amos S, Binda L, Chindo BA, Tseja A, Odutola AA, Wambebe C dan Gamaniel K. Neuropharmacological Effects of Hibiscus sabdariffa Aqueous Extract. *Pharmaceutical Biology* 2003;41:325-329.
40. Trubus Info Kit. Herbal Indonesia Berkhasiat. Bukti Ilmiah dan Cara Racik. *Trubus Info Kit*. Jakarta : Trubus. 2010; 8:1-21, 408-411.
41. Saefudin A, Rahayu V, Teruna HY. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Ed. Ke-1. Yogyakarta : Graha Ilmu. 2011: 1-75.

42. Sardjono SO. *Perkembangan Obat Tradisional Dalam Ilmu Kedokteran Indonesia dan upaya Pengembangannya Sebagai Obat alternatif*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 1994.
43. Departemen Kesehatan RI. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. *Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional*. 2000.
44. Dewoto H.R. Pengembangan Obat Tradisional Indonesia menjadi Fitofarmaka : Untuk Pemanfaatan Pada Pelayanan Kesehatan. *Pidato pada Upacara Pengukuhan sebagai Guru Besar Tetap dalam Bidang Farmakologi dan Terapeutik pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia*. Jakarta 14 Juli 2007.
45. Departemen Kesehatan RI. *Kebijakan Obat tradisional*. Depkes RI. 2007: 1-27.
46. Lazze MC, Pizzala R, Savio M, Stivala LA, Prosperi E, Bianchi L. Anthocyanins Protect Against DNA Damage Induced by Tert-butyl-hydroperoxide in Rat Smooth Muscle and Hepatoma Cells. *Mutation Research* 2003;535:103-115.
47. Dahiru D, Obi OJ, dan Umaru H. Effect of Hibiscus sabdariffa Calyx Extract on Carbon Tetrachloride Induced Liver Damage. *Biochem J* 2003; 15(1):27-33.
48. Reanmongkol W, Itharat A. Antipyretic Activity of The Extracts of Hibiscus sabdariffa Calyces L. in Experimental Animals. *Songklanakarinn J. Sci. Technol* 2007; 29:29-38.
49. Ali BH, Mousa HM, Mougy SE. The Effect of a Water Extract and Anthocyanins of Hibiscus sabdariffa L. on Paracetamol-induced Hepatotoxicity in Rats. *Phytother. Res* 2003;17:56-59
50. Salah AM, Gathumbi J, Vierling W. Inhibition of Intestinal Motility by Metanol Extracts of Hibiscus sabdariffa L. (Malvaceae) in Rats. *Phytother. Res* 2002; 16:283-285
51. Chang YC, Huang HP, Hsu JD, Yang SF, Wang CJ. Hibiscus Anthocyanins Rich Extract-Induced Apoptotic Cell Death In Human Promyelocytic Leukemia Cells. *TAAP Journal* 2005;205: 201-212.
52. Zarrabal OC, Waliszewski SM, Dulce MA, Dermitz B dkk. The Consumption of Hibiscus sabdariffa Dried Calyx Etanolic Extract Reduced Lipid Profile in Rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 2005; 60:153-159.
53. Olantuji LA, Adebayo JO, Oguntoye OB, Olatunde NO, Olatujni VA, Soladoye AO. Effects of Aqueous Extracts of Petals of Red and Green Hibiscus sabdariffa on Plasma Lipid and Hematological Variables in Rats. *Pharmaceutical Biology*. 2005; 43:471-474.

54. Kirdpon S., Nakorn S.N, Kirdpon W. Changes in Urinary Chemical Composition in Healthy Volunteers after Consuming Rosselle (*Hibiscus sabdariffa*Linn) Juice. *J.Med Assoc Thai* 1994;77(6):314-21.
55. Herrera-Arellano A, Flores-Romero S, Chaves-Soto MA, Tortoriello J. Effectiveness and Tolerability of A Standardized Extract from *Hibiscus Sabdariffa* in Patients with Mild to Moderate Hypertension, a Controlled and Randomized Clinical Trial". *Phytomedicine* 2004;11: 375-82.
56. Borisutpeth P. Anti-bacterial Activity of Thai Medicinal Plant Extracts on *Aeromonas hydrophilia* and *Streptococcus agalactiae* Isolated from Diseased Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *31<sup>st</sup> Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology*. 18-20 October 2005.
57. Suwandi T. *Efek Antibakteri dari Infusum Kelopak Hibiscus sabdariffa terhadap Streptococcus sanguinis (in vitro)*. Perpustakaan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. 2010.
58. Carranza FA, Newman MG, Takei HH, Carranza FA. *Clinical Periodontology*. 9<sup>th</sup> ed Philadelphia : WB Saunders. 2002; 64-69.
59. Nield JS, Willman DE. *Foundations of Periodontics for Dental Hygienest*. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkun. 2003: 54-55.
60. Nisengard RJ, Haake SK, Newman MG, Miyasaki KT. Microbial Interactions with the Host in Periodontal Disease. In : Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FAJr, eds. *Carranza's Clinical Periodontology*. 10<sup>th</sup> ed. St Louis : Saunders. 2006:228-50.
61. Fiorellini JP, Kim DM, Ishikawa SO. Clinical Features of Gingivitis. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FAJr, eds. *Carranza's Clinial Periodontology*. 10<sup>th</sup> ed. St. Louis : Saunders. 2006:362-72.
62. Samaranayake LP. *Essential Microbiology for Dentistry*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Churchill Livingstone. 2002: 41-7, 52-61, 95-8, 161-2, 207-16.
63. Mandel ID. Antimicrobial Mouthrinses : Overview and Update. *J Am Dent Assoc* 1994; 125 (suppl 2): 2s-10s.
64. Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identity of Viridans Streptococci Isolated From Cases of Infective Endocarditis. *J Med Microbiol* 1993; 39:179-82.
65. Herzberg MC, Nobbs A, Tao L, Killic A, Beckman E, Khammanivong A, Zhang Y. Oral Streptococci and Cardiovascular Disease: Searching for The Platelet Aggregation-Associated Protein Gene and Mechanisms of *Streptococcus sanguis*-Induced Thrombosis. *J Periodontol* 2005; 76(11): 2101-5.



66. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson M, Shi W. Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. *MMBR* 2007; 653-670.
67. Hauser G, Eva MK, Weiger R, Decker EM, Vonohle C, Meyer J. Adhesion of *Streptococcus sanguinis* to Dental Implant and Restorative Materials in vitro. *Dental Materials Journal* 2007; 26(3):361-266.
68. Kreth J, Zhang Y, Herzberg M. Streptococcal Antagonism in Oral Biofilm : *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *JB* 2008; 4632-4640
69. Quirynen M, Soers C, Desnyder M, Dekeyser C, Pauwels M, van Steenberghe D. A 0.05% Cetyl Pyridinium Chloride/ 0.05% Chlorhexidine Mouth Rinse During Maintenance Phase After Initial Periodontal Therapy. *J Clin Periodontol* 2005; 32(4): 390-400.
70. Mergenhagen SE, Sanberg AL. Molecular Basis of Bacterial Adhesion in the Oral Cavity. *Reviews of Infectious Diseases*. 1987; 9 (Suppl 5):5467-5474.
71. Kolenbrander PE, London J. Adherence Today, Here, Tomorrow : Oral Bacteria Biofilm. *JB*. 1993; 175(11): 3247-3252.
72. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial Interactions in Dental Biofilm. *J Dent Res* 2009;88(11): 982-990.
73. Haake SK. Microbiology of Dental Plaque. Available in URL. [http : // www.dent.ucla.edu/pic/members/microbio/mdphone.html](http://www.dent.ucla.edu/pic/members/microbio/mdphone.html). Accessed on 29 Desember 2010.
74. Lisgarten MA. Structure of the Microbial Flora Associated with Periodontal Health and Disease in Man : A light and Electron Microscopic Study. *J. of Periodontol* 1976; 47: 1-18.
75. Slot J dan Taubman M.A. 1992. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Mosby Yearbook. St. Louis, Philadelphia, Sidney, Toronto. 1992:363.
76. Haake SK. Microbiology of Dental Plaque. Available in URL : <http://www.dent.ucla.edu/pic/members/microbio/mdphome.html>. Accessed on 29 Juli 2006.
77. Mah TF dan George A O'Toole. Mechanism of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agent. *Trends Microbiol*. 2001; 9(1): 34-9.
78. Kolenbrander PE, Andersen RM, Blehert DS, Eglund PG, Foster JC, Palmer RJ. Communication among Oral Bacteria. *Microbiology and Oral Biology Review*. 2002; 66 (3): 486-505.

79. Costerton JW, Hilary M. *Lappin-scott Microbial Biofilm*. Cambridge : Cambridge University Press. 1995
80. Bowden GHW, YH Li. Nutritional Influence on Biofilm Development. *Adv Dent Res* 1997.
84. Lewis K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Review). 2001
82. Truper and de Clari. Streptococcus sanguinis. *Ijs.sgm journal* 1997; 47:908-909.
83. Xu P, Alves JM, Kitten T, dkk. Genome of The Opportunistic Pathogen Streptococcus sanguinis. *JB* 2007: 3166-3175.
84. Levinson W. *Review of Medical Microbiology and Immunology*. The McGraw-Hill Company. 2008. Hlm. 10-20.
85. Manson JD. Dan Eley BM. 1995. *Outline of Periodontics*. Ed. Ke-3. London. 1995:15-18.
86. Caufield PW, Dasanayake AP, Yihong L, Yaping P, Jay H, Hardin JM. Natural History of Streptococcus sanguinis in The Oral Cavity of Infants : Evidence for a Discrete Window of Infectivity. *IAI* 2000; 68:4018-4023
87. Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identify of viridians Streptococci Isolated From Cases of Infective Endocarditis. *J Med Microbiol* 1993; 39:179-82.
88. Ganiswarna SG. *Farmakologi dan Terapi*. Ed. Ke-4. Jakarta : Gaya Baru. 2005: 571-3.
89. Jawets, Melnick JL., Adelberg EA. *Medical Microbiology*. 19<sup>th</sup> ed. USA : Lange Medical Book. 1991:11, 15-20, 149-52, 154-55.
90. Newman N. *Oral Microbiology and immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. USA : W.B. Saunders Company. 1994:212-4.
91. Marsh PD. Microbial Aspects of The Chemical Control of Plaque and Gingivitis. *JDR* 1992;71(7):1431.
92. Departemen kesehatan RI, Dijen Pengawasan Obat dan Makanan. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cet ke-1. 2000:1-5, 9-32.
93. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Obat Kelompok Fito Terapi. Rencana Kerangka Tahap-tahap Pengembangan Obat Tradisional*. 1985.
94. Siregar F. Evaluasi Biologik Bahan Kedokteran Gigi. *Dental Journal FKG UI* 2000; 7 (ed. Khusus) : 21-27.

95. Maryani H dan Kristiana L. 2008. *Khasiat dan Manfaat Rosela*. Jakarta : PT Agro Media Pustaka. 2008: 6, 25-31.
96. Mardiah, Hasibuan S, Rahayu A, Ashadi RW. *Budidaya dan Pengolahan Rosella*. Ed. Ke-1. Jakarta : Agromedia. 2009.
97. Backer CA dan Bakhuizen RC. *Flora of Java*. Wolter-Noordhoff N. V. Groningen. 1965;2:134.
98. Cronquist A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York : Columbia University Press. 1981:78-80.
99. Widyanto PS dan Nelistya A. *Rosella Khasiat dan Ramuan*. Ed. Ke-1. Jakarta : Penebar Swadaya. 2008.
100. Devi M. *Dahsyatnya Khasiat Rosella*. Yogyakarta : Cemerlang Publishing. 2009.
101. Wirjatmadi B. Rosela. *Koran Kompas Edisi Minggu 7 des 2008*.
102. Hansawasdi C, Kawabata J, Kasai T. 2000. Alpha-Amylase Inhibitors From Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000;64, 1041-1.
103. Lin WL, Hsieh YJ, Chou FP, Wang CJ, Cheng MT, Tseng TH. Hibiscus Protocatechuic Acid Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Rat Hepatic Damage. *Arch. Toxicol* 2003; 77: 42-47.
104. Liu CL, Wang JM, Chu CY, Cheng MT, Tseng TH. In Vivo Protective Effect of Protocatechuic Acid on Tert-butyl Hydroperoxide-Induced Rat Hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol* 2002; 40: 635-641.
105. Tseng TH, Hsu JD, Lo MH, Chu CY, Chou FP, dan Huang CJ. Inhibitory Effect of Hibiscus Protocatechuic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin. *Cancer Lett.* 1998;126(2):199-207.
106. Lin TL, Lin HH, Chen MC, Lin MC, Chou MC dan Wang CJ. Hibiscus sabdariffa Extract Reduces Serum Cholesterol in Men and Women, *Nutrition Research* 2007;27:140-45.
107. Ojokoh OA. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) Calyx Diet and Histopatological Changes in Liver Albino Rats. *J Food Tec* 2006;5(2) : 110-113.
108. Ali BH, Naser AW dan Gerald B. 2005. Phytochemical, Pharmacological and Toxicologi Aspects of *Hibiscus sabdariffa* L : A. Review. *Phytotherapy Research* 2005;19: 369-375.
109. Okasha MAM, Abubakar MS, Bako IG. Study of the Effect of Aqueous *Hibiscus sabdariffa* Linn Seed Extract on Serum Prolactin Level of Lactating Female Albino Rats. *Eurojournal* 2008;22(4):575-583.

110. Kusmardiyana S, Melati I, dan Nawawi A. Detail Penelitian Obat Bahan Alam. 2007. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id> (diakses tanggal 15 januari 2011).
111. Watt JM, Breyer MG. 1962. *Abstracts of The Medicinal and Poissonous Plants of Southern and Eastern Africa*. 2<sup>nd</sup> ed. London : livingstone, ltd. 1962: 75-78.
112. Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Penerjemah : K. Padmawinata dan I. Sudiro. Bandung : ITB. 1987:58-68. 131-139.
113. Wilson SG, Dick HM. *Topley and Wilson's principle of bacteriology, virology and immunity*. 7<sup>th</sup> ed London : Edward Arnold Ltd. 1984:84.
114. Sterols. <http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm>. diakses 10/10/110
115. Phytosterol Ester dan Penyakit Jantung. 2005. [http://www.ot.co.id/research\\_life.html](http://www.ot.co.id/research_life.html). diakses 10/10/10.
116. Foerster H. MetaCyc pathway : Saponin Biosynthesis I. 2006. <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-5230&detail-level=3,29/09/10>
117. Ann EH. Tannin chemistry. 2002. <http://www.users.muohio.edu/hagermac/tannin.pdf>. diakses 29/09/10.
118. Ansel HC. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. 4<sup>th</sup> ed. Penerjemah : Farida Ibrahim. Jakarta : Universitas Indonesia. 1989.
119. Hargono D. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta : Badan Pengawas Obat dan Makanan. 1986:10-11, 16.
120. Depkes RI. *Simplisia dan Manfaat Tanaman Obat. Cara pembuatan simplisia*. Jakarta 1985 : 10.
121. Mustofa. *Fitofarmaka : Bagian Farmakologi-Pusat Kedokteran Tropis*. Yogyakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada. 2007.
122. Cappuccino J, Sherman N. *Microbiology : A Laboratory Manual*. 8<sup>th</sup> ed . San Fransisco : Benjamin Cummings. 2007
123. Benson HJ. *Benson's Microbiological Applications : Laboratory Manual in General Microbiology*. 10<sup>th</sup> ed. New York : McGraw-Hill Book Co. 2006.
124. Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E test to Agar Dilution, Broth Microdilution, and Agar Diffusion Susceptibility Testing Techniques by Using a Special Challenge Set of Bacteria. *JCM* 1991 : 533-538.

125. Casarett and Doull's *Toxicology : The Basis Science of Poissons*. 3<sup>rd</sup> ed London : Macmillan Publishing Company. 1986.
126. Lu FC. *Toksikologi Dasar : Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko*. Penerjemah : Edi Nugroho. Ed ke-2. UI Press. 1995.
127. Quyyumi AA. Endothelial Function in Health and Disease : New Insights Into the Genesis of Cardiovascular Disease. *Am J.Med.* 1998; 105:32S-39S.
128. Murata T, Yamaga T, Lida T, Miyazaki H dan Yaegakit. Classification and Examiner and Examinarion Halitosis. *IDJ* 2002; 52(3): 181-6.
129. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A. *Prognostic Significantly Principles of Chemical Safety*. Geneva : World Health Organizatin. 2000
130. Fishben L. *IPCS Training Module no.4 : General Scientific Principle of Chemical Safety*. Geneva : World Health Organization. 2000
131. Kumar V, Cotron RS, Robbins SL. Robbins Basic Pathology. In : *Cellular Injury Adaptation and Death*. Philadelphia : WB Saunders. 2003; 1-31.
132. Marck P. *Clinician's Guide To Experimental Surgery*. 1<sup>st</sup> ed. Singapore : Image Medicus.1994:1-16
133. Adeghate E, Drapper CE dan Singh J. Effect of Ageing On Changes In Morphology of The Rat Lacrimal Gland. In : *Lacrimal Gland, Tear Film and Dry Eye Syndrome 3*, Plenum Publisher. 2002 :103-107.
134. Mjor LA, Fejerskor O. *Embriology and Histology Rongga Mulut*. Alih bahasa Fazwishni Siregar. Widya Medica. Jakarta. 1990:218-224.
135. Sherwood L. *Fisiologi Manusia dari Sel ke System*. Alih bahasa Brahm et al 2 Jakarta: EGC. 2001: 269
136. Fedi, Peter F. *Silabus Periodonti*. Alih bahasa amalya Ed.IV. Jakarta : EGC :2004:94.
137. Cate and Nance A. *Oral Histology, Development, Structure, and Function*. Mosby. 2003: 192, 215, 229.
138. Sudiono, J. *Ilmu Patologi*. Jakarta : EGC. 2003:81-89.
139. Albert B, Lewis J, Raff M, Robert K, J.D. Watson, editors. *Biologi Molekular Sel : Mengenal sel 2* ed. Jakarta : PT Gramedia Pustaka Utama. 1994.
140. Ryan J. Introduction to Animal Culture (16/07/09). Available from : [http://209.85.175.104/search?q=cache:qvQ3REydVvsJ:www.corning.com/Lifesciences/technical\\_information/techDocs/intro\\_animal\\_cell\\_culture.pdf+Introduction+animal+cell+culture&hl=id&ct=clnk&cd=1&gl=id](http://209.85.175.104/search?q=cache:qvQ3REydVvsJ:www.corning.com/Lifesciences/technical_information/techDocs/intro_animal_cell_culture.pdf+Introduction+animal+cell+culture&hl=id&ct=clnk&cd=1&gl=id). Diakses 5/10/10.

141. Sigma-Aldrich. Cell Culture. (20/07/09); Available from : <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture.html>. Diakses 12/12/10
142. Freshney R. Culture of Animal Cells. New York : Willey-Liss : A manual of Basic Technique. 4<sup>th</sup> ed. Sigma-Aldrich. Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (20/07/2009). Available from : <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N=4D6429?SIGMA&N5=Product%20No./BRAND KEY&F=SPEC>. Diakses 12/12/10.
143. Altenburger R, Kissel T. The Human Keratinocyte Cell Line HaCat: An In Vitro Cell Culture Model for Keratinocyte Testosterone Metabolism. *Pharmaceutical research* 1999;16 (5) : 766-767.
144. Sabaliauskas V, Juciute R, Bukelskiene V, Rutkunas V, Vanagiene RT, Puriene A. In Vitro Evaluation of Cytotoxicity of Permanent Prosthetic Materials. *Stomatologija* 2011; 13:75-80.
145. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Meth* 1983; 65:55-63.
146. Hudson S, Smith C. Polysaccharide : Chitin and Chitosan : Chemistry and Technology of Their Use as Structural Material In : Kaplan DL (Ed). *Biopolymers From Renewable Resources* New York : Springer-Verlag: 1998.
147. Spagnuolo G, Schmalz G, Cosentino C, Rengo S, Schweikl H. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Amplifies TEGDMA-Induced Apoptosis in Primary Human Pulp Cell. *J. Dent Res* 2004;83:703.
148. Stanley L. *Basic Pathology* 2 ed. Tokyo : WB Saunders Company. 1976:89-102.
149. MTT test (20/07/2010); available from : <http://www.ib.amway.edu.pl/home/dslado/video.mtt.html>. Diakses 1 Nopember 2010.
150. Anonim. Crystal Violet. (en.wikipedia.org/wiki/Crystal\_violet). Diakses 1/11/10.
151. Hardy Jay. Gram's Serendipitous Stain. <http://www.hardydiagnostics.com/articles/Hans-Christian-Gram.pdf>. Diakses 2/11/10
152. Mathur S, Mathur T, Srivastava R, Khatri R. Chlorhexidine : The Gold Standar in Chemical Plaque Control. *NJPPP* 2011; 1 (2):45-50. (Review Article).
153. Jenkins S, Addy M, dan Wade W. The Mechanism of Action of Chlorhexidine : A Study of Plaque Growth on Enamel Inserts in Vivo. *J. Clin Periodontol* 1988; 15:415-424



154. Sterols. <http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.thm>. Diakses 10/10/110
155. Loomis TA. *Obat Tradisional dan Fitoterapi : Uji Toksikologi*. Yogyakarta : Fakultas Farmasi. UGM. 1986. Hal 233-238.
156. Hayes A. *Principle and Methods of Toxicology*. 4<sup>th</sup> edition. Boston: Edwards Brothers. 2001. Hal. 917-953.
157. Boukamp P, Petrussevska R, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusing N. Normal keratinization in A Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *J Cell Biol* 1988; 106 : 761-71.
158. Hwang JK, Shin JS, Pyun RY. Antibacterial Activity of Xanthorrhizol From Curcuma Xanthorrhiza Against Oral Pathogen. *Fitoterapia* 2000; 71 (3) : 321-323.
159. Yuniarti P. Efek antibakteri Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza* Roxb) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus sanguinis* (in vitro). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2011.
160. Cushnie TP dan Lamb A.J., Review Antimicrobial activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agent* 2005; 26:343-356.
161. Soetan KO, Oyekunie MA, Aiyelaagbe OO, Fafunso MA. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Saponins Extract of Sorghum Bicolor L. Moench. *AJOL* 2006; 5(23): 2405-2407
162. Ajizah A. Sensitivitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. *Bioscientiae* 2004; 1:31-8.
163. Fidinina N. *Efek Ekstrak Etanol Temulawak Terhadap Viabilitas Streptococcus sanguinis berdasar Uji Crystal Violet in vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2011.



**UNIVERSITAS INDONESIA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

JLN. SALEMBA RAYA NO. 4 JAKARTA PUSAT 10430  
TELP. (62-21) 31930270, 3151035  
FAX. (62-21) 31931412

**SURAT KETERANGAN LOLOS ETIK**

Nomor: 32 /Ethical Clearance/FGGUI/VI/2011

Setelah membaca dan mempelajari/mengkaji usulan penelitian yang tersebut di bawah ini.

Judul : "Potensi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *Hibiscus subdariffa* (Rosela) Terhadap *Streptococcus sanguinis* Penginduksi Gingivitis"

Nama Peneliti : Drg. Trijani Suwandi, Sp. Perio 0906598392

Sesuai dengan keputusan Anggota Komisi Etik, maka dengan ini Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia menerangkan bahwa penelitian tersebut dinyatakan lolos etik

Jakarta, 21 Juni 2011

Ketua Komisi Etik Penelitian FKGUI,

Mengetahui,  
a.n Dekan FKGUI,  
Wakil Dekan

  
Prof. Dr. M. Suharsini Soetopo, SU, drg. Sp.KGA(K) NIP. 195309201980032002

  
drg. Anton Rahardjo, MKM, PhD  
NIP. 195406021983031002





**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA**  
**( Indonesian Institute of Sciences )**  
**PUSAT PENELITIAN BIOLOGI**  
**( Research Center for Biology )**

Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong  
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Cibinong, 17 Maret 2010

Nomor : 291 /IPH.1.02/lf.8/III/2010  
 Lampiran : -  
 Perihal : Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan

Kepada Yth.  
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Triyani Suwandi


Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	Rosella	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Malvaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.

Plh. Kepala Bidang Botani  
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,

  
 Dr. Wahyu Widiyono, M.Si.  
 NIP. 195703221985031002

DF 5.10.1.2.

**LAPORAN HASIL UJI**  
No. Adm. : 73/T/LAB/II/10

Kepada Yth.  
**Trijani Sunandi**

Kondisi/Identifikasi Contoh : Simplisia  
Tanggal Penerimaan : 17 Februari 2010  
Tanggal Pengujian : 2 dan 17 Maret 2010

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian/Pemeriksaan	Hasil Pengujian/Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Rosela	Ekstrak dgn etanol 70% - Rendemen (%) Uji fitokimia : - Alkaloid - Saponin - Tanin - Fenolik - Flavonoid - Triterfenoid - Steroid - Glikosida	28,94  - ++++ +++ + +++ ++++ - ++	Maserasi  IK 5.4.01.31

**Keterangan**

- : Negatif
- + : Positif lemah
- ++ : Positif
- +++ : Positif kuat
- ++++ : Positif kuat sekali

Bogor, 18 Maret 2010  
Manajer Teknis,

*(Signature)*  
**Ma'mun, S.Si**

Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Surat menyurat agar memuat nomor administrasi. Hasil pengujian di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dilarang diperbanyak kecuali atas persetujuan tertulis dari Laboratorium Penelitian Balitro.

Lembar kedua disetujui oleh Manajer Administrasi.



Kementerian Pertanian  
 Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian  
 Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat  
 Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

Jalan Tentara Pelajar No. 3 Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor 16111  
 Telepon (0251) 8321879 Faximile (0251) 8327010 E-mail: balitro@isikem.net

**SERTIFIKAT PENGUJIAN**  
*CERTIFICATE OF ANALYSIS*

DF 5.10.1.2.

No. Adm. : 65/IT/LAB/II/12

Kepada Yth.  
 Drg. Trijani Suwandi  
 Jakarta

Kondisi/Identifikasi Contoh : Simplisia  
 Tanggal Penerimaan : 9 Februari 2012  
 Tanggal Pengujian : 9 - 15 Februari 2012

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian/Pemeriksaan	Hasil Pengujian/Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
1.	Rosella	- Kadar air (%)	8,03	Gravimetri
		- Kadar abu (%)	8,13	Gravimetri
		Ekstrak dengan etanol 70%		Maserasi
		- Rendemen (%)	22,2	
		- Berat jenis 25%/25°C	0,9036	Gravimetri

Bogor, 21 Februari 2012

Manajer Teknis

Ma'mun, S.Si

Apabila hasil uji telah dilakukan sebagaimana harusnya diterbitkan Surat menyurat agar pemenuhan administrasi. Hasil pengujian di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Apabila uji barang dipertanyakan kearah Dinas perhubungan tertulis dan Laboratorium Pengujian Rakyat.

Tertanda dan Legitimasi oleh Manajer Administrasi

## RINGKASAN

### Pendahuluan

Gingivitis atau peradangan gingiva merupakan awal dari penyakit periodontal atau periodontitis yang sering ditemukan dalam rongga mulut dan dapat terjadi pada semua kelompok umur.<sup>1,2,3</sup> Gingivitis umumnya bersifat kronis dan terjadi karena respon inang terhadap plak bakteri atau biofilm. Gambaran klinis berupa hilangnya perlekatan gingiva, gingiva kemerahan, udem, dan mudah berdarah pada waktu probing. Bila keadaan tersebut tidak dilakukan perawatan, maka dapat berkembang menjadi periodontitis kronis. Hasil penelitian pada beberapa dekade terakhir melaporkan adanya hubungan periodontitis kronis dengan beberapa penyakit sistemik antara lain penyakit jantung, diabetes melitus, serta kelahiran bayi preamatur atau bayi dengan berat badan lahir rendah dan lain-lain. Dari hasil berbagai penelitian yang mengkaitkan periodontitis dengan penyakit sistemik tersebut, akhirnya istilah “*Periodontal Medicine*” dikembangkan. Dengan demikian gingivitis dapat dikategorikan pada peradangan yang penting untuk diperhatikan.<sup>4,5</sup>

Berdasarkan survey yang dilakukan di Indonesia, prevalensi gingivitis mencapai 45,8% di daerah pedesaan dan 38,4% di daerah urban, serta meningkat dengan bertambahnya umur.<sup>6</sup> Etiologi utama gingivitis adalah plak gigi atau *biofilm* yang melekat pada permukaan gigi berstruktur lunak, berwarna kuning keabu-abuan.<sup>7,8</sup> Pembentukan plak dipelopori oleh bakteri *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* dan *Actinomyces naeslundii* sebagai *early colonizer*. Dalam beberapa hari, bakteri akan berkembang biak yang dapat mengakibatkan peradangan gingiva.<sup>9,10</sup> *S. sanguinis* berperan pada ajang perlekatan mikroorganisme lain yang lebih patogen.<sup>11</sup> Hal tersebut dimungkinkan karena bakteri tersebut memiliki kemampuan melakukan agregasi segera setelah gigi dibersihkan, dan menghasilkan *neuraminidase* yang berperan dalam pembentukan plak.<sup>12</sup>

Terapi lokal gingivitis berupa kontrol plak, skeling dan penghalusan akar, serta terapi penunjang seperti obat kumur. Sampai saat ini klorheksidin dianggap sebagai standar baku dalam perawatan periodontal, namun produk ini memiliki efek samping seperti pewarnaan ekstrinsik pada gigi dan lidah, rasa tidak enak, gangguan pengecap, iritasi pada mukosa mulut karena mengandung alkohol.<sup>9,13</sup>

Pengembangan obat kumur yang tidak mengandung alkohol menjadi satu hal yang penting untuk mendapatkan obat kumur dengan efek samping minimal, namun tetap memiliki efektifitas yang memadai.

Saat ini banyak dikembangkan obat kumur herbal yang diyakini mempunyai khasiat antibakteri dengan efek samping minimal, walaupun hal tersebut masih memerlukan pembuktian ilmiah. Pemerintah menggiatkan pemakaian obat bahan alam menjadi Obat Herbal Terstandar, yang nantinya diharapkan menjadi fitofarmaka. Salah satu tanaman obat yang banyak diteliti adalah ekstrak kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. sebagai antibakteri. Penelitian antibakteri kelopak *H. sabdariffa* L. telah dilakukan pd *M. tuberculosis*, *A. hydrophilia*, dan *S. agalactiae*.<sup>14,15</sup> Sampai saat ini belum ada penelitian mengenai pemanfaatan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sebagai antibakteri dalam bidang kedokteran gigi, khususnya dalam bidang periodontologi.

Penelitian pendahuluan menunjukkan infusum kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai aktifitas antibakteri terhadap *S. sanguinis* sebagai penyebab utama gingivitis pada uji kadar hambat minimal (KHM) dan uji bunuh minimal (KBM).<sup>16</sup> Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian pengembangan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. menuju Obat Herbal Terstandar yaitu dengan melakukan uji fitokimia, penetapan parameter standar, uji khasiat, uji keamanan dan efektivitasnya.

### **Masalah, Tujuan dan Manfaat Penelitian**

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dituangkan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

- 1). Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung golongan senyawa aktif yang bersifat antibakteri?;
- 2). apakah parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat ditetapkan?;
- 3). Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L mempunyai efek antibakteri terhadap *S. sanguinis*?;
- 4). Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman untuk digunakan dalam jangka waktu pendek (toksisitas akut)?;
- 5). Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman untuk digunakan dalam jangka waktu panjang (toksisitas subkronis)?;
- 6). Apakah ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. tidak bersifat toksik terhadap mukosa mulut?;
- 7). Apakah ekstrak etanol kelopak bunga

*H.sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *biofilm* *S. sanguinis* secara *in vitro*?

Tujuan penelitian adalah sebagai berikut : **1).** menetapkan golongan senyawa aktif yang bersifat sebagai antibakteri pada ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan uji fitokimia; **2).** menetapkan parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.; **3).** menganalisis daya antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* berdasarkan kadar hambat minimal (KHM), kadar bunuh minimal (KBM) dan zona hambat; **4).** menganalisis efek toksik ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap organ vital tikus berdasarkan uji toksisitas akut; **5).** menganalisis efek toksik penggunaan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap organ vital tikus berdasarkan uji toksisitas subkronis; **6).** menganalisis sitotoksitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap sel epitel dan fibroblast berdasarkan uji MTT dan **7).** menganalisis efektivitas ekstrak etanol kelopak bunga *H.sabdariffa* L sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm* secara *in vitro*.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mendukung program pemerintah dalam pengembangan tanaman obat menjadi obat herbal terstandar, memberikan manfaat penelitian yaitu dengan diketahuinya dosis efektif, parameter standar serta keamanan dari ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. serta efektivitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* sebagai antibakteri, dan memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sebagai bahan alternatif terapi penunjang gingivitis.

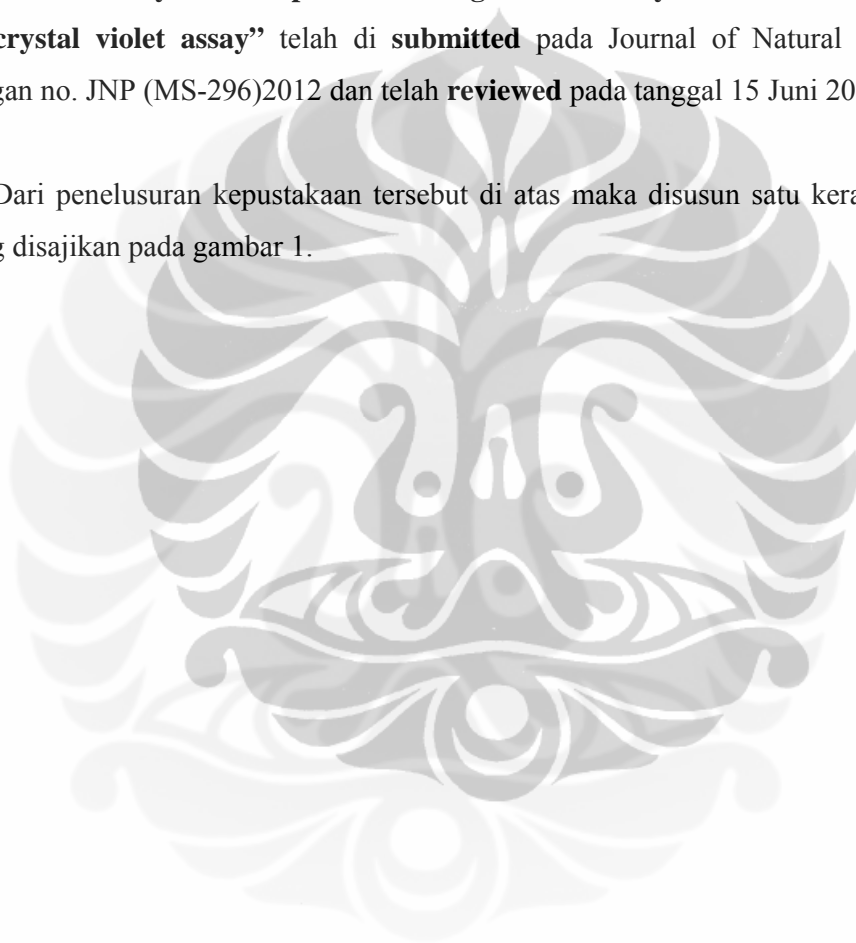
Dari uraian manfaat penelitian di atas, maka hasil penelitian akan dipublikasikan pada jurnal internasional dan potensi Hak Atas Kekayaan Intelektual (HAKI) dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia adalah sebagai berikut :

1. Penetapan parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. meliputi susut pengeringan, bobot jenis, kadar air dan kadar abu.
2. Daya antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berdasarkan nilai KHM, KBM dan zona hambat (mm).
3. Penetapan LD<sub>50</sub> ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.
4. Penetapan NOEL ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

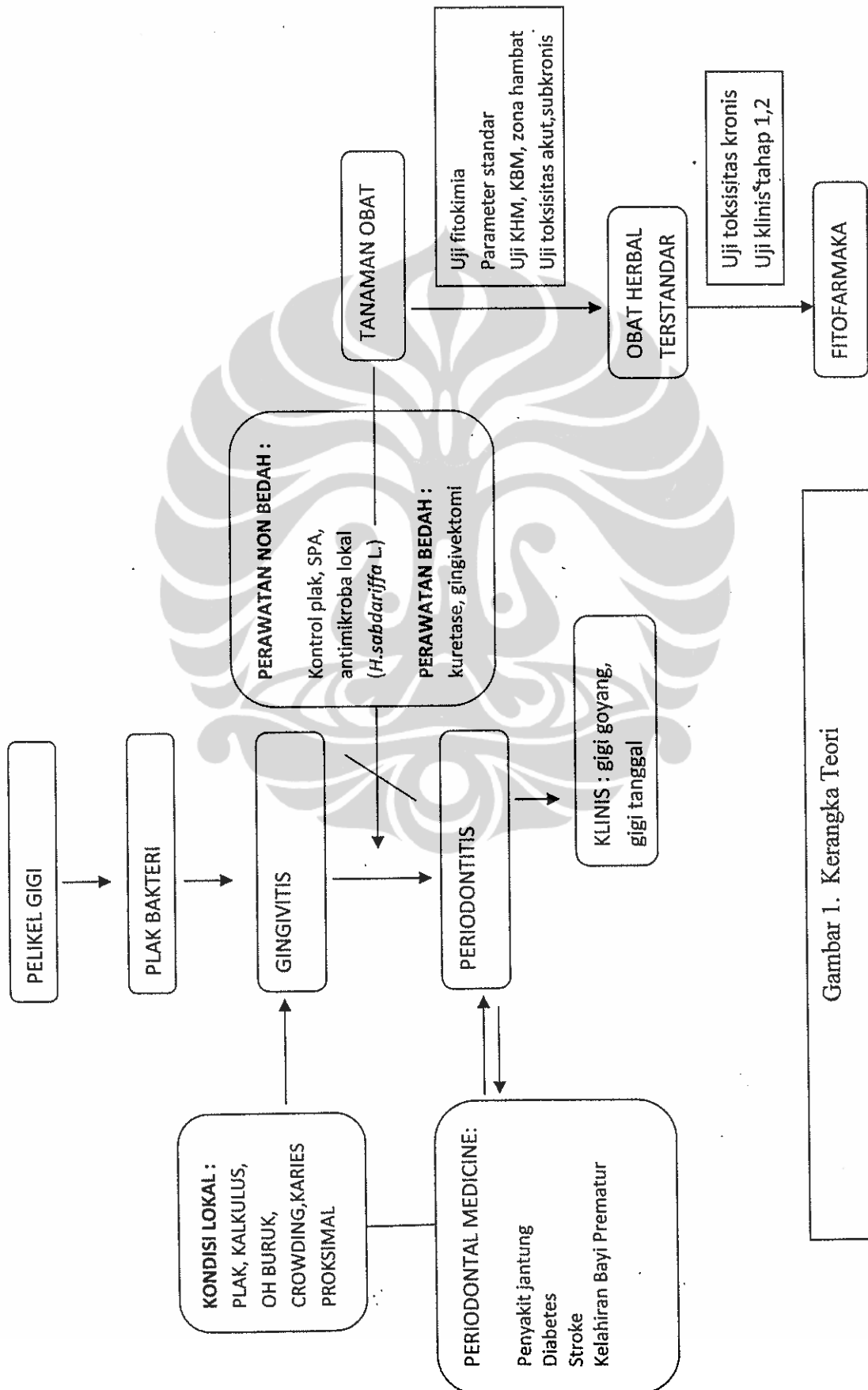
5. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman dan tidak toksik terhadap sel epitel dan fibroblast.
6. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam *biofilm* secara in vitro.

Salah satu hasil penelitian dengan judul **“Effect of ethanol extract of Hibiscus sabdariffa L calyx on Streptococcus sanguinis Viability in-vitro biofilm based on crystal violet assay”** telah di **submitted** pada Journal of Natural Products dengan no. JNP (MS-296)2012 dan telah **reviewed** pada tanggal 15 Juni 2012.

Dari penelusuran kepustakaan tersebut di atas maka disusun satu kerangka teori yang disajikan pada gambar 1.



**KERANGKA TEORI**



Gambar 1. Kerangka Teori



## KERANGKA KONSEP

Adapun kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada gambar 2–8.



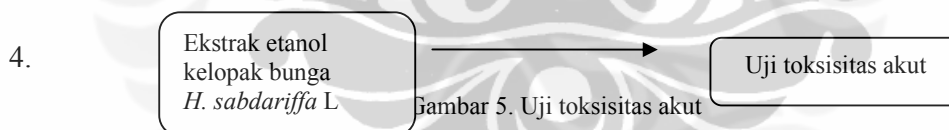
Gambar 2. Skringing Fitokimia



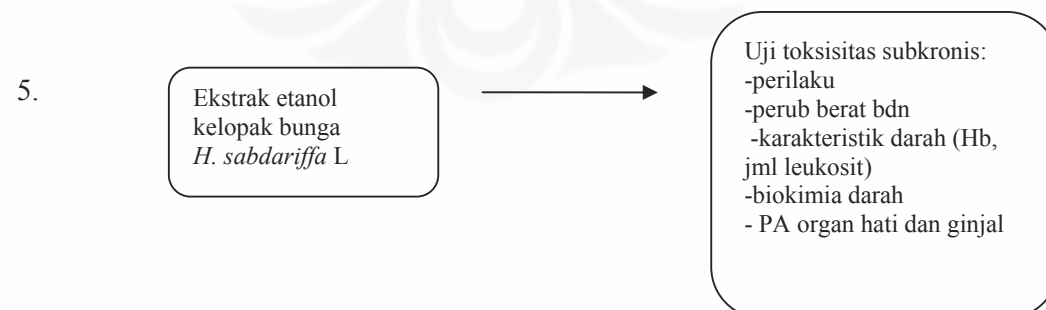
Gambar 3. Penetapan parameter standar



Gambar 4. Uji KHM, KBM, zona hambat



Gambar 5. Uji toksisitas akut



Gambar 6. Uji toksisitas subkronis



Gambar 7. Uji sitotoksitas

Gambar 8. Uji *biofilm*

### Hipotesis

Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L mempunyai golongan senyawa aktif yang berdaya antibakteri, yang dapat menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis* dalam biofilm, aman dan tidak toksik terhadap organ vital tikus *Sprague-Dawley*, sel epitel dan fibroblast serta parameter standarnya dapat ditetapkan.

### Metode dan Desain Penelitian

Metode Penelitian terdiri dari tujuh tahap penelitian yaitu uji kandungan golongan senyawa kimia menggunakan uji fitokimia, uji penetapan parameter standar baik non spesifik (pengukuran susut pengeringan, bobot jenis, kadar air dan kadar abu) maupun spesifik (identitas dan organoleptik), uji KHM, KBM dengan metode dilusi dan pengukuran zona hambat dengan metode difusi, uji toksisitas akut untuk mengetahui LD<sub>50</sub> dan toksisitas subkronis untuk menentukan NOEL (*No Observed Effect Level*), uji sitotoksitas dengan MTT assay untuk menentukan toksisitas terhadap epitel dan fibroblast dan uji *biofilm* dengan *crystal violet assay* untuk menganalisis efektifitas ekstrak dalam menurunkan potensi pertumbuhan *S. sanguinis*.

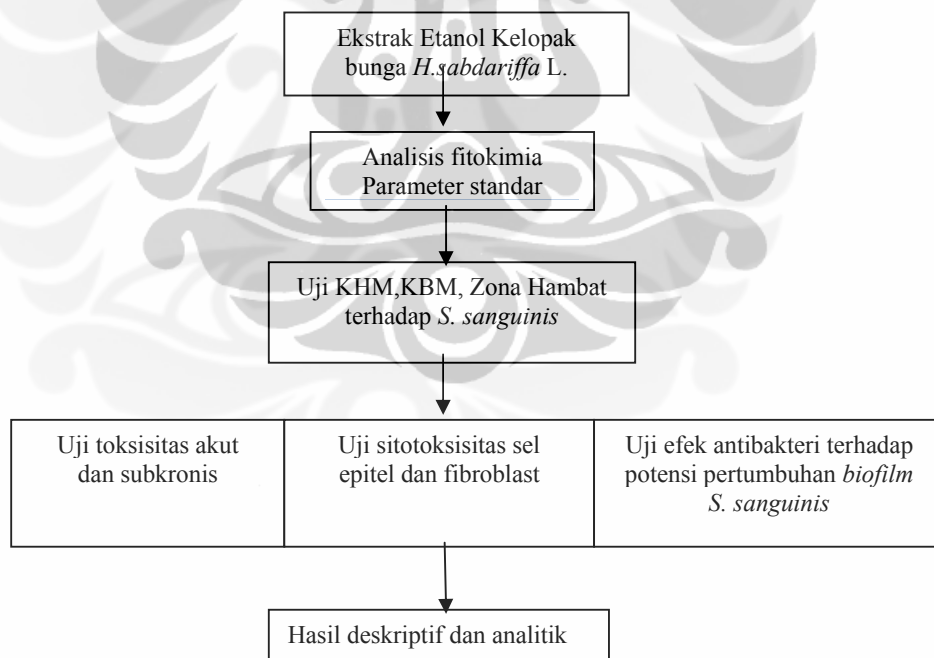
### Tempat Penelitian

Identifikasi tanaman di *Herbarium Bogoriense* bidang Botani Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Bogor. Pembuatan ekstrak etanol dan

uji fitokimia kelopak bunga *H. sabdariffa* L. di di Balai Tanaman Obat dan Aromatik (Ballitro) Bogor. Uji standarisasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. di Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. Cimanggu, Bogor. Uji KHM, KBM dan zona hambat di Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Uji toksisitas akut dan subkronis di Laboratorium Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Uji sitotoksitas di Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Uji efektivitas ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dalam menurunkan potensi pertumbuhan terhadap *biofilm S. sanguinis* di Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

### Alur Penelitian

Bagan alur penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Bagan Alur Penelitian

## Hasil dan Pembahasan

### Hasil Uji fitokimia

Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Golongan Senyawa Kimia yang Terkandung dalam Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

No	Gol.senyawa	Semi kuantitatif	Pembanding
7	Saponin	++++	buah lerak ( <i>Sapindus rarak</i> )
8	Tanin	+++	buah pinang ( <i>Areca catechin</i> )
9	Fenolik	+++	bunga cengkih ( <i>Syzygium aromaticum</i> )
10	Flavonoid	+++	kulit jeruk ( <i>Citrus</i> sp)
11	Triterfenoid	++++	daun pegagan ( <i>Centella asiatica</i> L)
12	Glikosida	++	daun digitalis ( <i>Digitalis purpurea</i> )

Keterangan :

7. Saponin memiliki nilai positif 4 (++++) dibandingkan dengan buah lerak
8. Tanin memiliki nilai positif 3 (+++) dibandingkan dengan buah pinang
9. Fenolik memiliki nilai positif 1(+++) dibandingkan dengan bunga cengkih
10. Flavonoid memiliki nilai positif 3(+++) dibandingkan dengan kulit jeruk
11. Triterfenoid memiliki nilai positif 4 (++++) dibandingkan dengan daun pegagan
12. Glikosida memiliki nilai positif 2 (++) dibandingkan dengan daun digitalis

Dengan demikian hipotesis ke-1 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. mengandung golongan senyawa aktif yang bersifat anti-bakteri yaitu saponin, tanin, fenolik, dan flavonoid.

### Hasil Uji Penetapan Parameter Standar

Hasil penetapan terhadap parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel.2. Hasil Penetapan Parameter Standar Ekstrak etanol Kelopak Bunga *Hibiscus sabdariffa* L.

Parameter standarisasi	Hasil/nilai ekstrak
<b>A.Parameter non spesifik</b>	
(1) susut pengeringan	22,2 %
(2) bobot jenis	0,9036 g/ml
(3) kadar air	8,03 %
(4) kadar abu	8,13 %
<b>B.Parameter spesifik</b>	
(1) identitas	Nama latin : <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. Nama bahan : kelopak <i>H.sabdariffa</i> L. Bagian tanaman yang digunakan : Kelopak bunga
(2) organoleptik	bentuk : cairan kental hitam Warna : hitam Rasa : asam Bau : manisan

Dengan demikian hipotesis ke-2 telah dibuktikan bahwa parameter standar ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat ditetapkan.

### Hasil Uji KHM, KBM dan Zona Hambat

Uji KHM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dilakukan dalam 7 konsentrasi yaitu 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%. Uji KHM dilakukan dengan pengamatan visual untuk melihat kekeruhan pada tabung reaksi. Kekeruhan menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri (tanda +), sedangkan tanda (-) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. KHM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* adalah 0,78%, artinya konsentrasi minimum ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. yang dapat menghambat pertumbuhan *S. sanguinis* adalah pada konsentrasi 0,78 %. Pada kontrol positif yaitu klorheksidin 0,1%, ada satu tabung mengalami sedikit kekeruhan, pada klorheksidin 0,2% tidak ada pertumbuhan bakteri. Pada kelompok kontrol negatif terdapat pertumbuhan bakteri (tabel 3 dan tabel 4).

Tabel.3 Hasil KHM Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

No tabung	ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L.								kontrol	
	Konsentrasi (%)								KLH	KLH
media	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,1	0,2	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Keterangan :

- d. (-) = tidak ada pertumbuhan *S. sanguinis*  
 e. (+) = ada pertumbuhan *S. sanguinis*  
 f. KHM dan KBM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* adalah 0,78%.

Tabel 4 Penetapan KHM, KBM Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L. Berdasarkan Penggoresan Pada Plat Agar

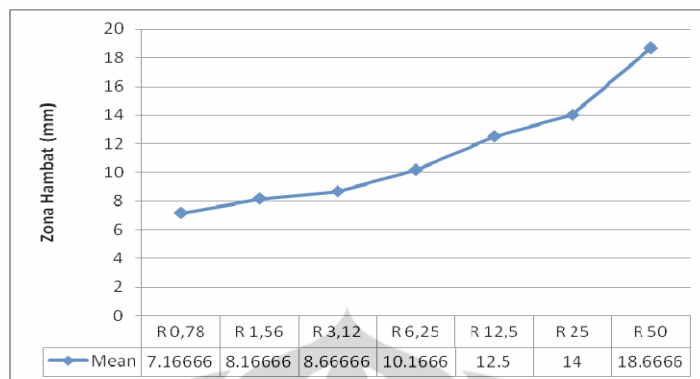
No Tabung	ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L.				kontrol		media
	Konsentrasi (%)				CHX	CHX	
	6,25	3,12	1,56	0,78	0,1	0,2	
1	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-	+

Keterangan :

- d. (-) = tidak ada pertumbuhan *S. sanguinis*  
 e. (+) = ada pertumbuhan *S. sanguinis*  
 f. KHM dan KBM ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis* sama yaitu 0,78%

Uji Kadar Bunuh Minimal (KBM) dilakukan dengan menggores semua hasil biakan pada media *thyoglycollate broth* didalam cawan petri, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator. Oleh karena pada konsentrasi 0,78% tidak terdapat pertumbuhan bakteri, maka KBM dapat ditetapkan nilai yang sama dengan KHM, yaitu pada konsentrasi 0,78%.

Hasil pengukuran rerata diameter zona hambat yang dibentuk oleh ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. berbagai konsentrasi terhadap *S. sanguinis* dengan uji difusi dan nilai kemaknaan hasil uji *oneway anova* dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Grafik Rerata Zona Hambat (mm) Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L. terhadap *S. sanguinis*

Seperti terlihat pada gambar 10. bahwa semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak etanol kelopak *H. sabdariffa* L. yang dipaparkan terhadap *S. sanguinis*, maka diameter zona hambat yang dihasilkan semakin besar. Diameter zona hambat terbesar diberikan oleh ekstrak etanol 50% yang menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 18,666 mm. Diameter zona hambat pada klorheksidin 0,1% sebesar 10,33 mm, sedangkan diameter zona hambat pada klorheksidin 0,2% sebesar 12,666 mm.

Dengan uji *one way anova*, *p* kelompok perlakuan dibandingkan dengan klorheksidin 0,1% menunjukkan bahwa peningkatan zona hambat terjadi sesuai peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* secara bermakna ( $p < 0,05$ ), kecuali pada konsentrasi 6,25%. ( $p > 0,05$ ) tidak berbeda bermakna. Pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol positif klorheksidin 0,2%, menunjukkan bahwa peningkatan zona hambat terjadi sesuai peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ), kecuali pada konsentrasi 12,5% ( $p > 0,05$ ), dan konsentrasi 25% ( $p > 0,05$ ).

Diameter zona hambat pada klorheksidin 0,1% sebesar 10,33 mm setara dengan ekstrak etanol konsentrasi 6,25% sebesar 10,1666 mm tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ), sedangkan diameter zona hambat pada klorheksidin 0,2% sebesar 12,666 mm setara dengan ekstrak etanol konsentrasi 12,5% sebesar 12,5mm tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Dengan demikian, hipotesis ke-3 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. memiliki konsentrasi bakteriosatik dan bakterisidal tertentu melalui uji Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Uji Kadar Bunuh Minimal (KBM) terhadap *Streptococcus sanguinis*, dengan hasil yaitu : KHM dan KBM sebesar 0,78%. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai zona hambat terhadap *S. sanguinis*.

### Hasil Uji Toksisitas Akut

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan LD<sub>50</sub> (*lethal dose* 50). Pengamatan dilakukan pada 1, 2, 4 jam setelah perlakuan sampai 24 jam menunjukkan tidak ada kematian pada hewan coba. Pengamatan yang sama dilanjutkan setiap hari selama 14 hari. Pada hari ke-14 tidak ditemukan kematian pada hewan coba. Pada pengamatan setelah pemberian ekstrak etanol kelopak *H. sabdariffa* L. per oral dengan dosis 15 g/kg BB, tampak hewan coba dalam keadaan aktif, feses encer, terlihat bulu putih mengkilap.

Aktivitas motorik menurun 1 jam setelah diberikan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Setelah 2 jam tikus aktif kembali seperti biasa. Pada 24 jam tampak tikus aktif, feses encer. feses didapatkan normal setelah hari ke-3. Hasil pengukuran berat badan menunjukkan sedikit penurunan selama dua hari, selanjutnya pada hari ke-3 berat badan meningkat kembali secara bertahap sampai akhir pengamatan. Pada akhir pengamatan berat badan tikus meningkat selama penelitian, aktif, bulu putih mengkilap. Pada akhir pengamatan di hari ke-14 persentase mortalitas adalah 0%, artinya tidak ada kematian tikus selama 14 hari (tabel 5).

Tabel 5. Pengamatan Mortalitas Tikus yang diberi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

Jenis kelamin	Dosis (g/kgBB)	Berat badan tikus Rata-rata (g)		Jumlah Kematian/ jumlah hewan coba
		Sebelum	sesudah	
Jantan	15	196,8	212,2	0/5

Pada akhir periode observasi, semua hewan coba didekapitasi dan dilakukan pemeriksaan makroskopis terhadap seluruh organ dalam. Hasilnya tidak ditemukan kelainan bentuk maupun warna pada organ hati, ginjal, paru, limpa, jantung, otak dan



usus. Hasil uji LD<sub>50</sub> terhadap ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. menunjukkan aman, tidak mengubah perilaku dan aktivitas tikus *Sprague-Dawley* dan LD<sub>50</sub> lebih besar dari 15 g/kgBB atau praktis tidak toksis.

Dengan demikian, hipotesis ke-4 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. tidak toksik terhadap organ vital tikus dalam jangka waktu pendek, dan didapatkan LD<sub>50</sub> > 15 g/kg BB.

### Hasil Uji Toksisitas Subkronis

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan keamanan suatu akumulasi obat. Pemberian diberikan secara oral pada tikus putih *Sprague-Dawley*. Pemeriksaan dilakukan menurut OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) *Guidelines for Testing of Chemical Section 4, Health Effects, 1981*). Pada pengujian toksisitas subkronis dilakukan pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. diberikan secara per oral melalui sonde lambung dalam bentuk cairan dengan volume dibawah 1% BB sekali pemberian.

Pada penelitian ini digunakan 40 ekor tikus *Sprague-Dawley* jantan dan betina usia 2-3 bulan dengan berat berkisar 140-180 gram. Tikus dibagi 4 kelompok secara acak dan masing-masing terdiri dari 10 ekor, 5 ekor jantan dan 5 ekor betina. Kelompok I, II, III mendapatkan bahan uji (ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.) dan kelompok IV sebagai kontrol.

Kemudian hewan coba diaklimatisasi selama 7 hari di dalam laboratorium pemeriksaan dengan pemberian makanan standar dan minum secukupnya. Selama percobaan tikus diberi makan dan minum secukupnya, kecuali sekitar 17-20 jam sebelum pemeriksaan, tikus dipuaskan dan hanya diberi air minum saja.

Bahan uji digunakan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dengan dosis 1,25g/kgBB, 2,5 g/kgBB dan 5 g/kg BB. Pada kelompok I terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina dosis 1,25 g/kgBB. Kelompok II terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina dosis 2,5 g/kgBB. Pada kelompok III terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina dosis 5 g/kgBB. Kelompok IV terdiri dari 5 ekor jantan dan 5 ekor betina kontrol.

Pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dilakukan selama 30 hari. Pengamatan dilakukan selama 30 hari meliputi penimbangan berat badan setiap

hari, perubahan tingkah laku dan gejala klinik diamati. Pada akhir pengujian tikus didekapitasi dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan hemoglobin, leukosit, SGOT, SGPT, kreatinin dan ureum serta dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis organ-organ dalam seperti hati, ginjal, jantung, paru, limpa, otak, dan usus.

Hasil pengujian toksisitas subkronis sebagai berikut : Hasil pengamatan perilaku hewan uji jantan dan betina selama 30 hari pada semua kelompok tidak menunjukkan kelainan. Tidak ditemukan kematian pada semua hewan coba baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. Dari hasil pengamatan terlihat bahwa secara umum tidak ada perbedaan perilaku antara kelompok uji dan kelompok kontrol, tikus aktif, bulu putih mengkilap. Hasil pengamatan berat badan dapat dilihat pada tabel 6. Terlihat bahwa tidak ada perbedaan bermakna antar kelompok ( $p > 0,05$ ) : Tidak ada perbedaan bermakna berat badan tikus jantan dan betina pada hari ke-1 dan ke-30 antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Pada probabilitas *post hoc* ( $p$  dalam tanda kurung) masing-masing kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ )

Tabel 6. Berat Badan Rata-Rata Tikus Jantan dan Betina (gram,  $\bar{x} \pm SD$ )

Jenis kelamin	Hari ke	kontrol (K)	ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L.			p antar kel
			dosis 1,25 g/kgBB	dosis 2,5 g/kgBB	dosis 5 g/kgBB	
Jantan	1	150,4±11,82	150,4±13,41 (p=1,00)	150,8±15,52 (p=1,00)	153,2±17,13 (p=0,993)	0,98
	30	184,8±17,95	199,2 ±14,99 (p=0,68)	188 ±16,87 (p=0,994)	198 ±21,83 (p=0,740)	0,62
Betina	1	160±14,91	158,8±19,49 (p=1,00)	146,4±11,89 (p=0,655)	157,2±18,48 (p=0,995)	0,58
	30	187,2±16,90	184 ±18,54 (p=0,993)	174 ±8,09 (p=0,677)	182 ±19,91 (p=0,970)	0,74

$p$  antar kelompok ( $p > 0,05$ ) : Tidak ada perbedaan bermakna berat badan tikus jantan dan betina pada hari ke-1 dan ke-30 antar kelompok ( $p > 0,05$ ). Pada probabilitas *post hoc* ( $p$  dalam tanda kurung) masing-masing kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Hasil pemeriksaan Hemoglobin dan leukosit dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Nilai rata-rata Hb dan leukosit ( $\bar{x} \pm SD$ ) tikus jantan dan betina setelah pemberian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Parameter		kontrol (K)	ekstrak etanol kelopak bunga <i>H. sabdariffa</i> L.			Sig
			dosis 1,25g/kg	dosis 2,5g/kg	dosis 5 g/kg	
Hb	Jantan	14,08±0,20	13,74±0,69 (p=0,421)	13,88±0,65 (p=1,000)	13,72±0,44 (p=0,310)	0,76
(g%)	Betina	14,08±0,27	13,68±0,65 (p=0,548)	13,96±0,34 (p=0,690)	14,24±0,44 (p=0,69)	0,71
Leukosit	Jantan	17.160±512	16.760±941 (p=0,690)	17.600±565 (p=0,310)	20.360±898 (p=0,08*)	0,01***
( $\Sigma/mm^3$ )	Betina	17.960±344	17.560±542 (p=0,310)	17.480±652 (p=0,222)	19.460±140 (p=0,03*)	003***

\*p < 0,05 lebih tinggi dari kontrol

\*\*\*p < 0,05 ada perbedaan antar kelompok

Pada tabel 8 terlihat tidak ada perbedaan bermakna pada pemeriksaan Hb antar kelompok maupun antar kelompok perlakuan dibandingkan kontrol ( $P > 0,05$ ) baik pada tikus jantan maupun betina. Pada pemeriksaan leukosit, terdapat sedikit kecenderungan semakin besar dosis ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. semakin tinggi kadar leukositnya. Nilai rata-rata leukosit kelompok tikus yang mendapat ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dosis 5 g/kg BB lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol baik pada tikus jantan maupun betina, dan secara statistik berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ).

Hasil pemeriksaan kimia darah seperti SGOT, SGPT, kreatinin dan urea tampak pada tabel 8.

Tabel 8. Pengaruh Berbagai Dosis Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* ( $x \pm SD$ ) Terhadap Kimia Darah Tikus Jantan dan Betina

Parameter	jenis kelamin antar kelompok	kontrol (K)	ekstrak etanol Kelopak Bunga <i>H. sabdariffa</i> dosis			p
			1,25g/kg	2,5g/kg	5 g/kg	
SGOT (U/L)	Jantan	73,17 $\pm$ 7,93	76,72 $\pm$ 4,31 (p=0,548)	76,67 $\pm$ 2,77 (p=0,69)	76,91 $\pm$ 5,08 (p=0,69)	0,648
	Betina	72,27 $\pm$ 5,67	77,86 $\pm$ 4,44 (p=1,00)	76,09 $\pm$ 4,22 (p=0,564)	75,39 $\pm$ 4,62 (p=0,69)	0,730
SGPT (U/L)	Jantan	31,91 $\pm$ 7,92	31,06 $\pm$ 0,77 (p=0,222)	30,88 $\pm$ 9,65 (p=0,342)	29,39 $\pm$ 5,80 (p=0,347)	0,586
	Betina	30,39 $\pm$ 3,52	30,27 $\pm$ 2,87 (p=0,324)	29,22 $\pm$ 4,95 (p=0,352)	28,69 $\pm$ 0,88 (p=0,365)	0,815
Ureum (mg%)	Jantan	21,93 $\pm$ 2,57	21,86 $\pm$ 0,62 (p=0,222)	20,99 $\pm$ 2,62 (p=0,346)	22,11 $\pm$ 1,22 (p=0,62)	0,796
	Betina	21,63 $\pm$ 1,05	21,72 $\pm$ 1,8 (p=0,222)	21,13 $\pm$ 1,37 (p=0,421)	21,82 $\pm$ 3,94 (p=0,387)	0,936
Kreatinin (mg%)	Jantan	0,43 $\pm$ 0,10	0,43 $\pm$ 0,10 (p=0,222)	0,43 $\pm$ 0,03 (p=0,222)	0,43 $\pm$ 0,02 (p=0,256)	0,997
	Betina	0,47 $\pm$ 0,11	0,46 $\pm$ 0,10 (p=0,222)	0,45 $\pm$ 0,04 (0,356)	0,44 $\pm$ 0,03 (p=326)	0,656

SGOT, SGPT, Ureum dan Kreatinin baik pada tikus jantan dan betina tidak berbeda secara bermakna ( $p > 0,05$ ). pada antar kelompok, maupun antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol.

SGOT, SGPT, Ureum dan Kreatinin baik pada tikus jantan dan betina tidak berbeda secara bermakna ( $p > 0,05$ ). pada antar kelompok, maupun antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol.

Pada pemeriksaan berat organ dalam dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Berat Organ Dalam (per 100 g BB) Tikus Jantan dan Betina ( $x \pm SD$ )

Organ	jenis kelamin	kontrol (K)	Kelompok perlakuan dosis			p antar kelompok
			1,25g/kg	2,5g/kg	5 g/kg	
Hati	Jantan	5,06 $\pm$ 0,80	4,60 $\pm$ 0,61 (p=0,548)	4,56 $\pm$ 0,54 (p=0,310)	5,06 $\pm$ 0,78 (p=1,000)	0,514
	Betina	4,86 $\pm$ 0,44	4,13 $\pm$ 1,02 (p=0,151)	3,84 $\pm$ 0,44 (p=0,32)	4,19 $\pm$ 0,70 (p=0,95)	0,103
Ginjal	Jantan	1,25 $\pm$ 0,16	1,29 $\pm$ 0,26 (p=0,690)	1,20 $\pm$ 0,15 (p=0,548)	1,26 $\pm$ 0,20 (p=0,841)	0,832
	Betina	1,11 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,11 (p=0,841)	1,05 $\pm$ 0,06 (p=0,095)	1,16 $\pm$ 0,13 (p=0,548)	0,272
Paru	Jantan	1,32 $\pm$ 0,15	1,25 $\pm$ 0,10 (p=0,421)	1,31 $\pm$ 0,11 (p=1,000)	1,18 $\pm$ 0,10 (p=0,151)	0,168
	Betina	1,23 $\pm$ 0,04	1,21 $\pm$ 0,27 (p=0,690)	1,18 $\pm$ 0,14 (p=0,411)	1,24 $\pm$ 0,07 (p=0,841)	0,785
Limpa	Jantan	0,47 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,04 (p=0,095)	0,47 $\pm$ 0,12 (p=0,690)	0,45 $\pm$ 0,08 (p=0,841)	0,590
	Betina	0,48 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,08 (p=0,151)	0,35 $\pm$ 0,02** (p=0,005)**	0,48 $\pm$ 0,13 (p=0,841)	0,062
Jantung	Jantan	0,55 $\pm$ 0,04	0,58 $\pm$ 0,10 (p=0,841)	0,56 $\pm$ 0,04 (p=1,000)	0,50 $\pm$ 0,0 (p=0,310)	0,798
	Betina	0,62 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,17 (p=0,421)	0,47 $\pm$ 0,04** (p=0,05)**	0,62 $\pm$ 0,10 (p=0,841)	0,095
Otak	Jantan	1,56 $\pm$ 0,04	1,52 $\pm$ 0,10 (p=0,690)	1,58 $\pm$ 0,08 (p=0,841)	1,53 $\pm$ 0,06 (p=0,690)	0,814
	Betina	1,49 $\pm$ 0,17	1,44 $\pm$ 0,10 (p=0,310)	1,47 $\pm$ 0,08 (p=0,548)	1,57 $\pm$ 0,07 (p=0,421)	0,190
Usus	Jantan	10,52 $\pm$ 1,90	10,21 $\pm$ 0,74 (p=1,00)	9,51 $\pm$ 1,02 (p=0,421)	12,01 $\pm$ 2,22 (p=0,310)	0,224
	Betina	11,20 $\pm$ 0,68	10,38 $\pm$ 2,20 (p=0,690)	8,50 $\pm$ 0,60** (p=0,05)**	11,20 $\pm$ 1,93 (p=1,00)	0,041*

\*p &lt; 0,05 lebih tinggi dari kontrol

\*\*p &lt; 0,05 lebih rendah dari kontrol

\*\*\*p &lt; 0,05 ada perbedaan antar kelompok

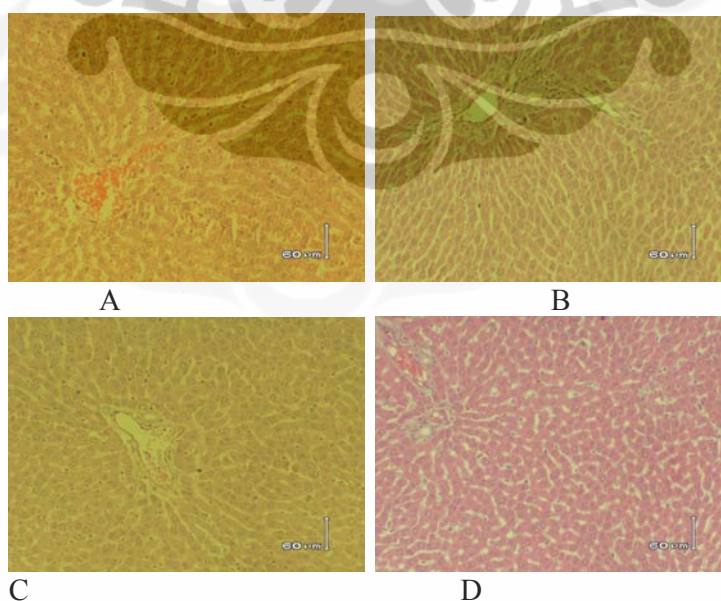
Pada tabel 9. terlihat bahwa berat rata-rata hati, ginjal, paru, limpa, jantung, otak dan tikus pada kelompok tikus jantan tidak berbeda bermakna antar kelompok perlakuan dan kontrol, maupun antara kelompok perlakuan dibandingkan kontrol, tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ), sedangkan berat rata-rata hati, ginjal, paru, dan otak tikus betina tidak berbeda bermakna antar kelompok perlakuan dan kontrol, maupun antara kelompok perlakuan dibandingkan kontrol, tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ), kecuali berat limpa, jantung dan usus pada tikus betina lebih rendah daripada kontrol, berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ).

### Pengamatan Organ secara Makroskopis dan mikroskopis

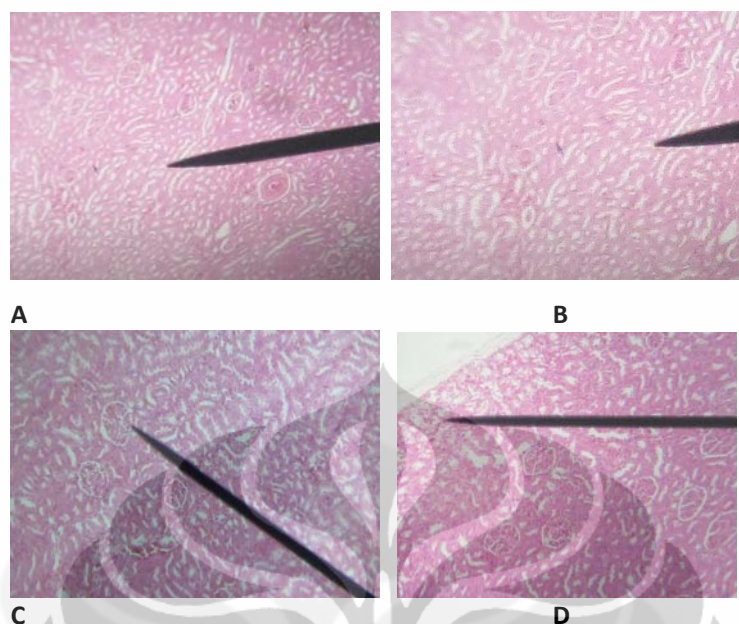
Pada kelompok kontrol, secara makroskopis tidak ada kelainan ukuran dan bentuk, kekenyalannya normal. Sebagian besar kelompok perlakuan tidak mempunyai kelainan ukuran dan bentuk, mempunyai berat organ lebih kecil daripada kontrol.

Pada pemeriksaan histopatologi tidak ditemukan kelainan spesifik khususnya pada organ hati dan ginjal. Hampir semua organ hati tikus pada semua kelompok menunjukkan tidak ada kelainan spesifik, kecuali seekor tikus kelompok dosis 2,5 g/kg BB terdapat dilatasi sinusoid dan dua tikus pada kelompok kontrol mengalami sedikit dilatasi sinusoid, tetapi masih dalam batas normal. Hasil pengamatan histopatologi organ hati tikus *Sprague-Dawley* jantan dan betina terlihat pada gambar 11. menunjukkan tidak ada kelainan spesifik.

Sebagian besar ginjal tikus pada semua kelompok dosis baik dosis 1,25 g/kgBB, kelompok dosis 2,5 g/kgBB, kelompok dosis 5 g/kg BB serta kelompok kontrol tidak ditemukan kelainan spesifik. Hanya ada beberapa tikus ditemukan dilatasi tubulus dan sedikit nekrosis tubulus di bagian korteks, dan masih dalam batas normal. Keadaan ini tidak hanya ditemukan pada kelompok perlakuan, tetapi juga ditemukan pada kelompok kontrol. Hasil pengamatan histopatologi organ ginjal tikus *Sprague-Dawley* jantan dan betina terlihat pada gambar 12.



Gambar 11. Gambaran mikroskopis organ hati tikus jantan dan betina. A). kelompok kontrol; B). kelompok 1,25 g/kgBB; C). kelompok 2,5 g/kgBB; D) kelompok 5 g/kgBB. Semua organ hati tampak normal, tidak ada kelainan spesifik.



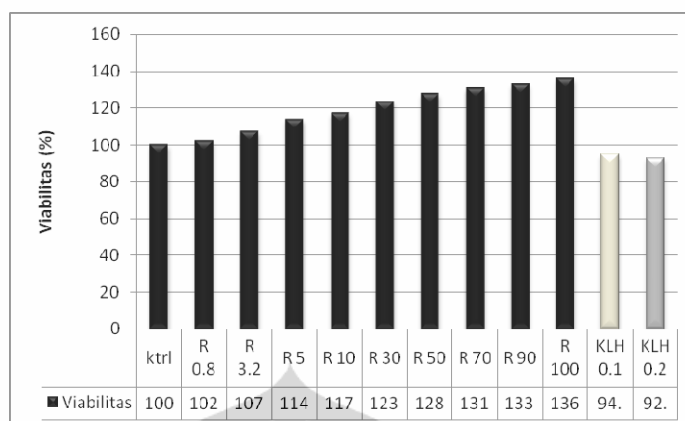
Gambar 12. Gambaran mikroskopis Organ Ginjal Tikus Jantan dan Betina; A). kelompok Kontrol terlihat sel tubulus normal; B). Kelompok 1,25 g/kgBB terlihat sel tubulus normal, C).Kelompok 2,5 g/kg BB terlihat glomerulus normal; D). Kelompok 5 g/kgBB terlihat sedikit dilatasi tubulus pada daerah korteks, tapi masih dalam batas normal.

Dengan demikian, hipotesis ke-5 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. tidak toksik terhadap organ vital tikus dalam jangka waktu panjang dan nilai NOEL (*No Observed Effect Level*) adalah 1,25 g/kg BB.

### Hasil Uji Sitotoksisitas

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui sitotoksisitas dari ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* terhadap sel epitel dan fibroblast. Efek ekstrak etanol kelopak *H. sabdariffa* terhadap sel epitel dan fibroblast ditentukan berdasarkan uji MTT dan dinyatakan dalam persentase viabilitas sel terhadap kontrol. Dari masing-masing kelompok, diambil rata-rata nilai absorbansi (OD atau *optical density*) dan dihitung *standar deviasi* dalam kelompok konsentrasi yang sama. Lalu nilai absorbansi tersebut dinyatakan ke dalam persentase terhadap kelompok kontrol sebagai viabilitas sel. Nilai absorbansi dan viabilitas sel epitel dapat dilihat pada gambar 13. Gambaran mikroskopis sel epitel kelompok kontrol dan perlakuan epitel dapat dilihat pada gambar 14.





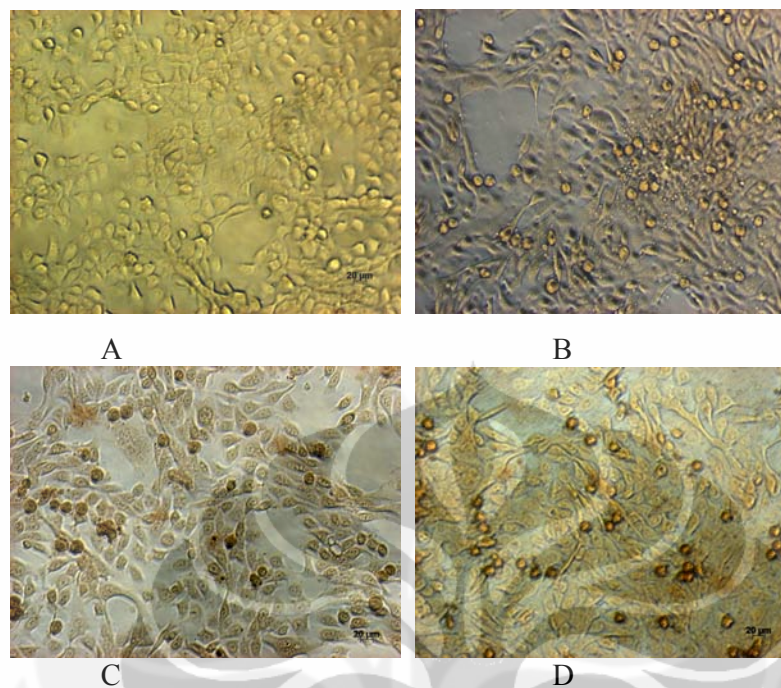
Gambar 13. Grafik Viabilitas (%) Sel Epitel Setelah Dipaparkan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L. selama 24 jam

R = *H. sabdariffa* 0,8% -100%      Ktrl = kontrol sel      KLH= klorheksidin

Viabilitas sel epitel kelompok perlakuan meningkat sesuai dengan peningkatan konsentrasi dan viabilitasnya lebih tinggi dari kelompok kontrol (100%), sedangkan viabilitas pada kelompok kontrol positif yaitu klorheksidin 0,1% (94,87%) dan 0,2% (92,79%) memiliki viabilitas lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol (100%). Semua kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. memiliki viabilitas lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% dan 0,2%.

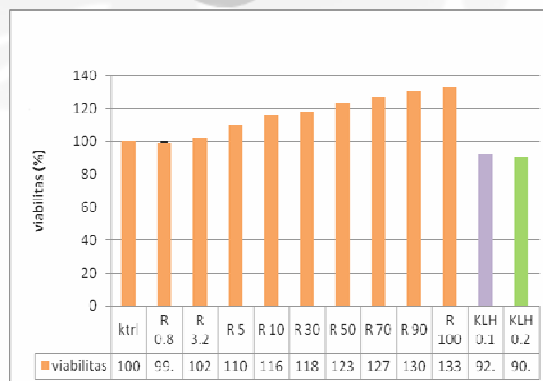
Terlihat bahwa persentase viabilitas sel tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi 100% dan menurun seiring dengan menurunnya konsentrasi yang diberikan, sedangkan persentase viabilitas terendah terdapat pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% (94,87%) dan 0,2% (92,79%). Di bawah ini terdapat gambaran sel epitel kontrol, setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 50% dan 100% serta kontrol klorheksidin yang terlihat dengan mikroskop *inverted Zeiss* (gambar 14. A-D).





Gambar 14. Gambaran Mikroskopis Sel Epitel: A). kelompok kontrol; B). kelompok klorheksidin (pembesaran 100x); C) kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 50% (pembesaran 100x); D). setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 100% (pembesaran 100x).

Sitotoksik ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap sel fibroblast ditentukan berdasarkan viabilitas sel dalam persentase terhadap kontrol. Nilai absorbansi dan viabilitas sel fibroblast dapat dilihat pada gambar 15. Gambar sel fibroblast kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

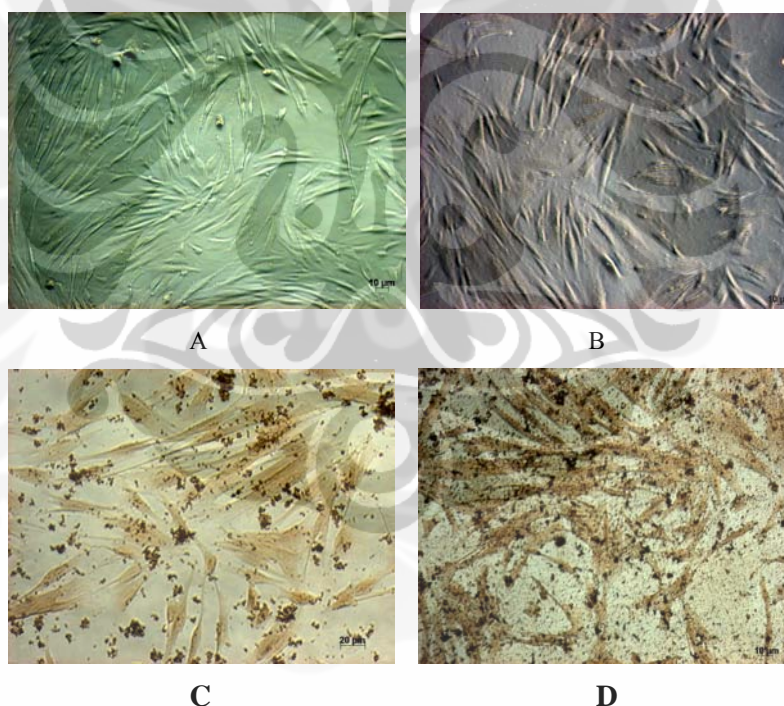


Gambar 15. Grafik Viabilitas (%) Sel Fibroblast Setelah Dipaparkan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kelopak Bunga *H. sabdariffa* L.

Ktrl : kontrol, R : Ekstrak *H. sabdariffa* L. KLH : klorheksidin

Viabilitas sel primer fibroblast kelompok perlakuan lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol (100%), kecuali kelompok perlakuan 0,8%, sedangkan pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% dan 0,2% memiliki viabilitas lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol (100%).

Terlihat bahwa persentase viabilitas sel tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi 100% dan menurun seiring dengan menurunnya konsentrasi yang diberikan. Sedangkan persentase viabilitas terendah terdapat pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0,1% (92,52%) dan 0,2% (90,36%). Di bawah ini terdapat gambaran sel epitel kontrol, setelah perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 50% dan 100% serta kontrol klorheksidin yang terlihat dengan mikroskop *inverted Zeiss* (gambar 16. A-D).

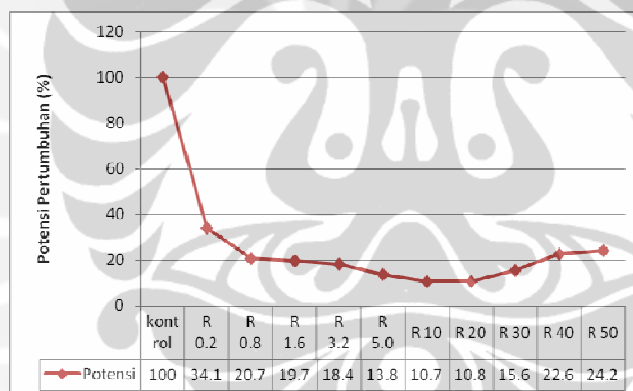


Gambar 16. Gambaran mikroskopis sel Fibroblast; A). kelompok kontrol (pembesaran 100x); B). Kelompok klorheksidin (pembesaran 100x); C). Kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 50% (pembesaran 200x); D). setelah perlakuan *H. sabdariffa* L. 100% (pembesaran 200x).

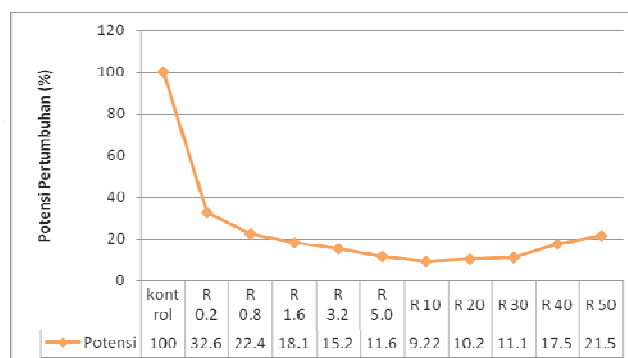
Dengan demikian, hipotesis ke-6 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. aman dan tidak toksik terhadap sel epitel dan fibroblast.

### Hasil Uji *Biofilm*

Pada penelitian orientasi pertama, dilakukan pengenceran *S. sanguinis* dari pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$ . Penghitungan dari hasil biakan bakteri dengan konsentrasi  $10^{-1}$  hingga  $10^{-6}$  sulit dihitung karena koloni terlalu padat. Pada hasil biakan bakteri dengan konsentrasi  $10^{-6}$  kepadatan koloni sudah berkurang dan mudah dihitung. Namun pada hasil pengenceran bakteri dengan pengenceran  $10^{-7}$  hingga  $10^{-8}$ , koloni tumbuh sangat sedikit. Dengan demikian pada penelitian ini ditentukan pengenceran bakteri dengan pengenceran  $10^{-6}$  karena memenuhi kriteria yaitu tidak terlalu padat dan dapat dihitung. Rata-rata jumlah koloni pada pengenceran  $10^{-6}$  adalah 636 CFU/mL. Hasil uji *biofilm* terhadap potensi pembentukan Hasil uji *biofilm* terhadap potensi pembentukan *biofilm S. sanguinis* dalam fase *adherence* ditampilkan pada gambar 17., dan fase maturasi *biofilm* ditampilkan pada gambar 18.



Gambar 17. Potensi Pertumbuhan *Biofilm S. sanguinis* dalam fase *Adherence Biofilm* (20 jam)



Gambar 18. Potensi Pertumbuhan *Biofilm S. sanguinis* Fase Maturasi (24 jam)

Potensi pertumbuhan *biofilm S. sanguinis* 20 jam pada kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif. Nilai rerata OD pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0.1% (20.47%) setara dengan kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 0.8% (20.75%), tidak ada perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ). Nilai rerata OD kelompok klorheksidin 0.2% (10.66%) setara dengan kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. konsentrasi konsentrasi 10% (10.73%), tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ), dan 20% (10.80%) dengan tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Potensi pertumbuhan *biofilm S. sanguinis* 24 jam pada kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif. Nilai rerata OD pada kelompok kontrol positif klorheksidin 0.1% (18.47%) setara dengan kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. 1,6% (18,12%), tidak ada perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ). Nilai rerata OD kelompok klorheksidin 0.2% (9,26%) setara dengan kelompok perlakuan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. konsentrasi konsentrasi 10% (9,22%), tidak berbeda bermakna ( $p > 0,05$ ).

Dengan demikian, hipotesis ke-7 telah dibuktikan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. dapat menurunkan pertumbuhan *biofilm S. sanguinis* dan efektivitas antibakteri ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

dalam menurunkan pertumbuhan biofilm *S. sanguinis* yang setara dengan klorheksidin.

## SIMPULAN DAN SARAN

### SIMPULAN

Setelah melalui rangkaian penelitian, telah dibuktikan bahwa :

1. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mengandung senyawa fenol, flavonoid, tanin dan saponin yang bersifat antibakteri.
2. Parameter Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat ditetapkan.
3. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. mempunyai efek antibakteri terhadap *S. sanguinis* pada konsentrasi 0,78%.
4. Ekstrak etanol kelopak *H. sabdariffa* L. aman dan tidak toksik pada penggunaan jangka pendek berdasarkan uji toksisitas akut, dan didapatkan LD<sub>50</sub> adalah 15 g/kg BB
5. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. aman dan tidak toksik pada penggunaan jangka panjang berdasarkan uji toksisitas sub kronis, dan didapatkan nilai NOEL 1,25 g/kg BB.
6. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. Sabdariffa* L. tidak toksik terhadap sel epitel maupun sel fibroblast berdasarkan uji *MTT assay*.
7. Ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. dapat menurunkan potensi pertumbuhan *biofilm Streptococcus sanguinis*.

### SARAN

Dari hasil penelitian ini maka dapat diajukan beberapa saran : Perlu penelitian lebih lanjut mengenai bentuk sediaan yang tepat untuk dipergunakan dalam rongga mulut, khususnya untuk mengobati gingivitis. Diperlukan penelitian terhadap jaringan keras gigi untuk melihat pengaruhnya terhadap kekerasan email serta pengaruh warna ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap email gigi. Diperlukan penelitian ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. terhadap penyembuhan gingivitis secara *in vivo* dan uji klinis. Diperlukan pengembangan lebih lanjut untuk menjadikan ekstrak etanol kelopak bunga *H. sabdariffa* L. sebagai fitofarmaka

melalui uji klinis, dan uji keamanan kronis, serta diharapkan dapat bekerjasama dengan pihak farmasi atau pabrik obat untuk memproduksi ekstrak kelopak bunga *H. sabdariffa* L.

Hasil penelitian yang didapatkan dalam penelitian ini akan ditindaklanjuti untuk mendapatkan HAKI (Hak Atas Kekayaan Intelektual), serta publikasi ilmiah pada jurnal internasional.





## SUMMARY

### Introduction

Gingivitis or gingival inflammation is the first stage of periodontal diseases or periodontitis which are generally found in oral cavity and can attack people of all ages.<sup>1,2,3</sup> Usually gingivitis is chronic and attack people due to host response to plaque bacteria or biofilm. Its clinical symptoms are loss of gingival attachment, redness of gingiva, swollen gums, bleeding when brushing and flossing. If there is no treatment of these symptoms, it can lead to a more serious or chronic periodontitis, which according to the researches in the last decades it has something to do with a few systemic diseases like heart diseases, diabetes mellitus, premature birth delivery or under weight babies and the like. From the results of various researches which study about the relation between periodontitis and systemic diseases, periodontal medicine is developed. So, gingivitis can be categorized as inflammatory diseases that attention is needed.<sup>4,5</sup>

According to surveys done in Indonesia, gingivitis prevalence has reached 45.8% in suburban areas and 38.4% in urban areas; and it is also due to the increase of the age. The main etiology of gingivitis is the accumulation of plaque or biofilm that forms constantly on teeth surface which have soft structure and whose colour is yellowish grey.<sup>7,8</sup> This plaque is a result of some bacteria: like *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* as *early colonizer*. In a few days these bacteria will multiply themselves that can cause gingival inflammation.<sup>9,10</sup> *S. sanguinis* serves to attach or stick other micro organisms which are more pathogen.<sup>11</sup> This happens because the bacteria have an ability to aggregate soon after the teeth are cleaned; and they can produce neuramidase which function in the accumulation of the plaque.<sup>12</sup>

Local gingivitis therapy can be plaque control, scaling and root planing, as well as supporting therapy like mouthwash. Up to know chlorhexidine is assumed to be the main standard in periodontal treatments, but this product has side effects like extrinsic coloring on teeth and tongue, unpleasant taste, tasting disturbances, irritation on oral mucosa due to alcohol.<sup>9,13</sup> The development of mouthwash which does not

consist of alcohol becomes very important to get mouthwash with minimal side effects, but it still has sufficient effectiveness.

Right now, a lot of companies develop many herbal mouthwashes that are believed to have antibacteria peculiarity with minimal side effects. Eventhough, a further scientific research needs to be done to prove it. Government has encouraged the uses of natural herbs as Scientific Based Herbal Medicine, which is hoped to be phytopharmaca. One of the herbal plants studied is an extract of *Hibiscus sabdariffa* Linn (*H. sabdariffa* L) calyxes. Up to now there has not been any research about the use of *H. sabdariffa* L calyxes in dentistry, especially peridontologi.

An antibacteria research on *H. sabdariffa* L has been done on *M. tuberculosis*, *A. hydrophilia*, and *S. agalactiae*.<sup>14,15</sup> The previous research has shown that infusum of *H. sabdariffa* L. calyx has antibacteria function to *Streptococcus sanguinis* as the main cause of gingivitis in Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) tests.<sup>16</sup>

### **Research Problems, Objectives and Benefits of the Research**

Based on the research background, the research problems are: **1).** Do ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes consist of active antibacterial substances?; **2).** Can a standard parameter of ethanol extracts *H. sabdariffa* L. calyxes be determined?; **3).** Do ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes have antibacterial effects on *S. sanguinis*?; **4).** Is the use of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes safe in a short term (acute toxicity)?; **5).** Is the use of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes safe in a long term (subchronic toxicity)?; **6).** Are ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes not toxic to epithelial and fibroblast cells?; **7).** Can ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes slow down the potency of *S. sanguinis* growth in *in vitro* biofilm?

The purpose of the research is to find out active substances which function as antibacteria in ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes using phytochemical test to determine the standard parameter of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes, to analyze the influence of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes on *S. sanguinis* bacteria using Minimal Inhibitory Concentration test (MIC), Minimal Bactericidal Concentration (MBC) and inhibition zone, to analyze toxic effects of ethanol extracts



of *H. sabdariffa* L. calyxes on vital animal organs (e.g. mice) using acute toxicity test, to analyze toxic effects of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes on vital animal organs (e.g. mice) using subchronic toxicity test, to analyze toxic effects of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L on epithelial and fibroblast cells using cytotoxicity test (MTT assay), and to analyze the effectiveness of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes as antibacteria on the potency of *S. sanguinis* growth in *in vitro* biofilm.

Hopefully the research would be useful to support government program in developing herbs as standardized herbal medicine which can give methodological benefits by being able to know effective dose, standard parameter and the safety of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes as well as the effectiveness of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes as antibacteria. It is hope to inform the public about the use of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes as alternative substances in supporting gingivitis therapy.

From the research description above, the potencies of Intellectual Property Rights or *Hak Atas Kekayaan Intelektual (HAKI)* from Faculty of Dentistry, Indonesian University are as follows:

1. The standard parameter of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes including dried weight, specific gravity, water and ash contents.
2. Antibacteria influence of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes using Minimal Inhibitory Concentration test (MIC), Minimal Bactericidal Concentration (MBC) tests and inhibition zone.
3. The assessment of LD<sub>50</sub> ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes.
4. The assessment of NOEL ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes
5. Ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes are safe and not toxic to epithelial and fibroblast cells.
6. Ethanol extracts of *H. sabdariffa* L calyxes can slow down the potency of *S. sanguinis* growth in *in vitro* biofilm.

# THEORETICAL FRAMEWORK

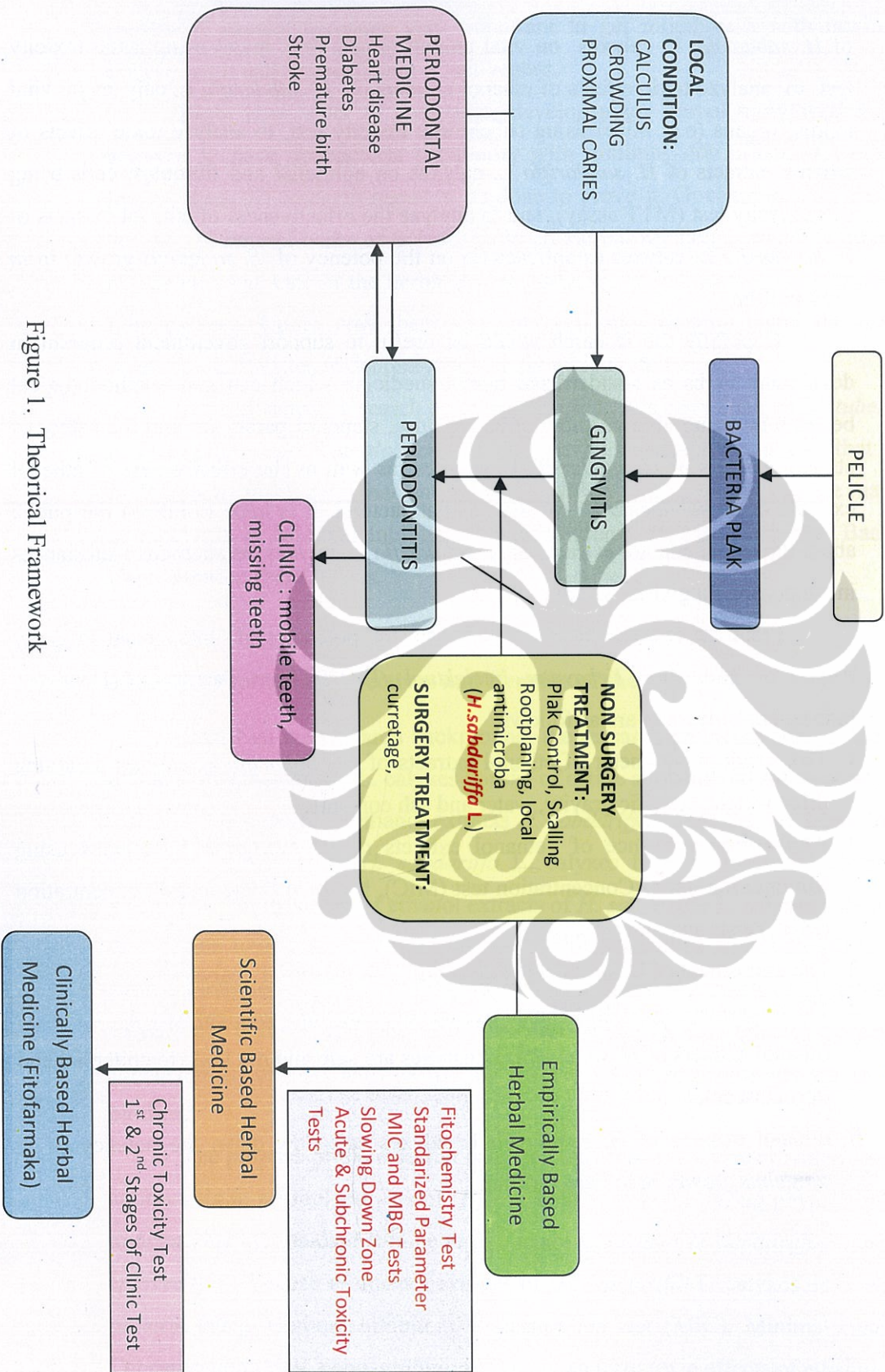


Figure 1. Theoretical Framework

## Framework of Concepts

The framework of Concepts can be seen from Figures 2–8.

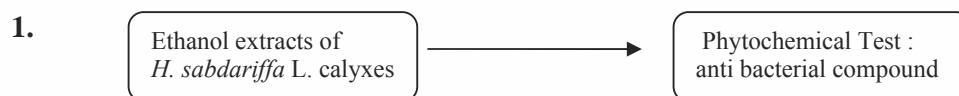


Figure 2. Phytochemical Screening



Figure 3. Determination of Standar Parameter



Figure 4. MIC, MBC, inhibition zone Test



Figure 5. Acute Toxicity Test

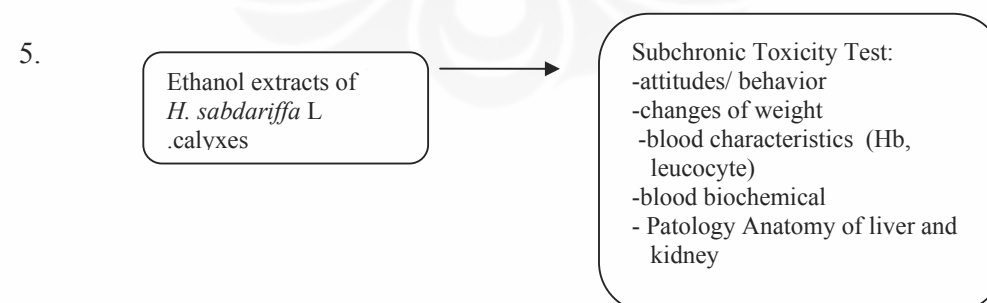


Figure 6. Subchronic Toxicity Test

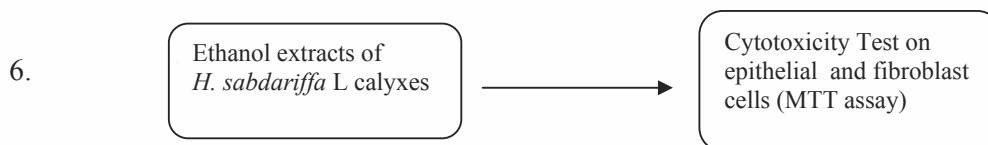


Figure 7. Cytotoxicity Test



Figure 8. Biofilm Test

### Hyphotheses

Ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces has active substances which function as antibacterial, reduce the potency of *S. sanguinis* growth in *in vitro* biofilm, are safe and not toxic to vital organs of *Sprague-Dawley* mice, epithelial and fibroblast cells, and its standard parameter can be determined.

### Research Design and Methods

There are seven stages in this research, which are: **1).** the test to find out the content of chemical substances using fito chemistry test; **2).** the test of standard parameter, either non specific (dried weight, specific gravity, water and ash contents) or specific (identity and organsoleptic); **3).** MIC, MBC tests with dilution method and measurement of inhibition zone with diffusion method; **4).** acute toxicity test to find LD<sub>50</sub>; **5).** subchronic toxicity test to determine NOEL (*No Observed Effect Level*); **6).** cytotoxicity test with MTT assay to determine toxicity toward epithelial cells and fibroblast, and **7).** biofilm test with *crystal violet assay* to analyze the effectiveness of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces as antibacteria in slowing down the growth of *S. sanguinis*.

## Place of the Research

Herbs are identified in Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Bogor. The ethanol extracts and phytochemical test of *H. sabdariffa* calyxes are done in Balai Tanaman Obat dan Aromatik (Ballitro) Bogor. Standardization test of *H. sabdariffa* extracts is in Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik, Cimanggu, Bogor. MIC, MBC tests and inhibition zone are done in Laboratorium Oral Biology Faculty of Dentistry Indonesian University. Acute and subchronic test are done in Laboratorium Pharmacology and Therapeutik Faculty of Medicine Indonesian University, Cytotoxycity test is done in Laboratorium Oral Biologi Faculty of Dentistry Indonesian University. The effectiveness test of extract ethanol of *H. sabdariffa* calyxes in slowing down the growth of *S. sanguinis* in biofilm is done in Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

## Flow chart of the Research.

The flow chart of the research can be seen in Figure 9.

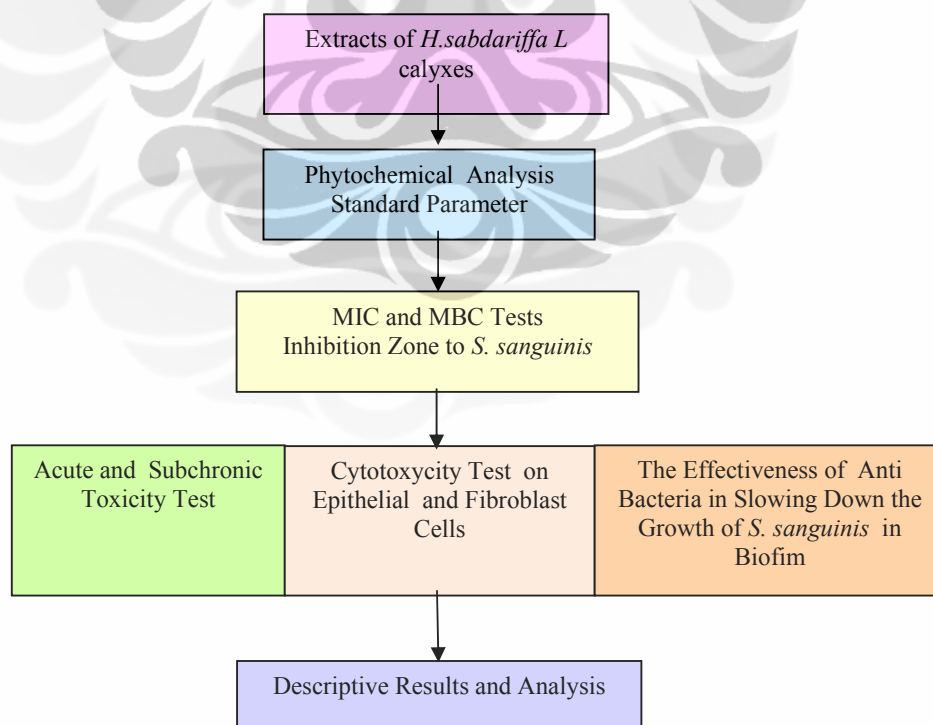


Figure 9. The Flow Chart of the Research



## Analysis and Discussions

### The Results of Phytochemical Analysis

It can be seen from Table 1.

Table 1. Phytochemical Constituents of Plant Extracts

No	Scientific Name	Semi Quantitative	Comparison
13	Saponin	++++	<i>Sapindus rarak</i>
14	Tannins	+++	<i>Areca catechin</i>
15	Phenol	+++	cloves ( <i>Syzygium aromaticum</i> )
16	Flavonoid	+++	lemon/ orange zest ( <i>Citrus</i> sp)
17	Triterfenoid	++++	leaves of <i>Centella asiatica L</i>
18	Glycoside	++	leaves of <i>Digitalis purpurea</i>

#### Remarks :

13. Saponin has positive value of 4 (++++) compared with *Sapindus rarak*
14. Tannins has positive value of 3 (+++) compared with *Areca catechin*.
15. Phenol has positive value of 1(+++) compared with cloves (*Syzygium aromaticum*).
16. Flavonoid has positive value of 3(+++) compared with lemon/ orange zest.
17. Triterfenoid has positive value of 4 (++++) compared *Centella asiatica L* leaves
18. Glycoside has positive value of 2 (++) compared with *Digitalis purpurea* leaves

Thus, the first hypothesis stating that ethanol extracts of *H. sabdariffa L.* calyxes consist of active bacterial substances like saponin, tannin, fenolic, dan flavonoid is proven.

### The Results of Standard Parameter Test

The results of Standard Parameter Test of ethanol extracts of *H. sabdariffa L.* calyxes can be seen in Table 2.

Table 2. The Results of Standard Parameter Test of Ethanol Extracts of *Hibiscus sabdariffa*

Standard Parameter	Results/ value of the extract (% Yield)
L. Calyxes	
A. Non Specific Parameter	
(1) dried weight	22.2 %
(2) specific gravity	0.9036 g/ml
(3) water contents	8.03 %
(4) ash contents	8.13 %
B. Specific Parameter	
(1) identity	Scientific name : <i>Hibiscus sabdariffa</i> L Vernacular name: <i>H.sabdariffa</i> Plants part used: calyxes
(2) organoleptic	Form : thick black liquid Color : black Taste : acid Scent : sweets

Thus, the second hypothesis stating that the standard parameter of ethanol extracts from *H. sabdariffa* L. calyxes can be determined is proven.

### The results of MIC and MBC Tests and Inhibition Zone

MIC test of ethanol extracts from *H. sabdariffa* L. calyxes has been done in 7 concentration: 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%. MIC test is done by having visual observation to see muddiness in glass tubes. The muddiness shows bacteria growth (+ clue), whereas (-) clue shows that there is no bacteria growth. The results of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes are obtained in concentration 0.78%, which means the minimum concentration of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes that can slow down the growth of *S. sanguinis* is in concentration of 0.78%. In Chlorhexidine positive control of 0.1% in the tubes, it shows that one tube has become a little bit muddy. In Chlorhexidine of 0.2%, there has been no bacteria growth; while in control with some media, there has been bacteria growth (Tabel 3 and Tabel 4).

Table 3. MIC Results of Ethanol Extracts of *H. sabdariffa* L Calyxes

No of Tube	Ethanol Extracts									Control	
	Concentration (%)									CHX	CHX
Media	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.1	0.2		
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

## Remarks :

- g. (-) = there is no growth of *S. sanguinis*
- h. (+) = there is some growth of *S. sanguinis*
- i. MIC and MBC of ethanol extracts of *H. sabdariffa* calyxes to *S. sanguinis* is 0.78%

Tabel 4 Scratches on Agar Plates (done in *triplo*)

No of Tube	Extracts of <i>H.sabdariffa</i>				Control		Media
	Concentration (%)				CHX	CHX	
	6.25	3.12	1.56	0.78	0.1	0.2	
1	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	-	+

## Remarks:

- g. (-) = there is no growth of *S. sanguinis*
- h. (+) = there is some growth of *S. sanguinis*
- i. MIC and MBC of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes to *S. sanguinis* is 0.78%

Minimal Bactericidal Concentration (MBC) test is done by scratching the results of breeding on *thyoglycollate broth* media in a Petri plate. Then, it is incubated for 24 hours at 37°C in an incubator. The results of MBC are obtained similar to MIC test, which are in concentration of 0.78%. The average measurements of inhibition zone formed by ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes in various concentration to *S. sanguinis* with diffusion method and *oneway anova* test can be seen in and figure 10. below.



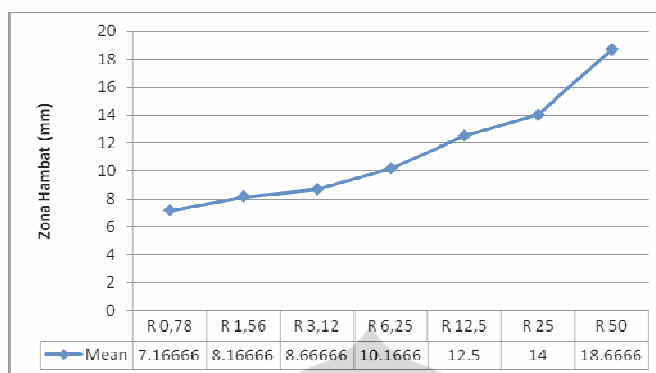


Figure 10. The Inhibition zone (mm) of ethanol extract of *H. sabdariffa* L. calyxes to *S. sanguinis*

As seen in Figure 10, the higher the concentration of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes to *S. sanguinis* is, the bigger the diameter of inhibition zone it will produce. The biggest diameter of inhibition zone produced by ethanol extracts 50% is 18.666 mm at average. The diameter of inhibition zone in chlorhexidine 0.1% is 10.33 mm, while the diameter of inhibition zone in chlorhexidine 0.2% is 12.666 mm.

In Table 5, it shows the statistical test to compare positive control of Chlorhexidine 0.1% with 0.2% using *one way anova*. Using *one way anova* test, the comparison of p with chlorhexidine shows the increased inhibition zone which happens according to the increased concentration of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes significantly ( $p < 0,05$ ), except in concentration of 6.25% ( $p_{1,000} > 0,05$ ) which is not significant. If it is compared with positive control of chlorhexidine 0.2%, the increased inhibition zone is in line with the increased concentration of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes significantly ( $p < 0,05$ ), except in concentration of 12.5% ( $p_{1,000} > 0,05$ ), and in concentration of 25% ( $p_{0,150} > 0,05$ ).

The diameter of inhibition zone in chlorhexidine 0.1% is 10.33 mm which is equal to ethanol extracts in concentration of 6.25% (10, 1666 mm) in significantly ( $p_{1,000}$  at which  $p > 0,05$ ). Meanwhile, the diameter of inhibition zone in chlorhexidine 0.2% is 12.666 mm which is equal to ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes in concentration of 12.5% as big as 12.5 mm insignificantly ( $p_{1,000}$  at which  $p > 0,05$ ).

Thus, the third hypothesis stating that ethanol extracts of *H. sabdariffa* L calyxes has bacteriosatic concentration and certain bactericidal to *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 using Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) tests is proven. The MIC and MBC of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes is 0.78% and the ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes have inhibition zone to *S. sanguinis*.

### The Results of Acute Toxicity Test

The test is aimed to determine LD<sub>50</sub> (*lethal dose*<sub>50</sub>). Observations were done after one, two and four hours of the experiment until 24 hours to make sure the experiment activity. The observations were continued every day for 14 days. On the 14<sup>th</sup> day, the mice were still alive. After being given the ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes orally with the dose of 15 gr/kg weight, it showed that the mice were active and their feces was thin. Their motoric activities have slowed down one hour after being given the ethanol extracts. After 2 hours, the mice were active again like they used to be. In 24 hours, the mice were active but their feces was thin. The normal feces was obtained after the 3<sup>rd</sup> day. The mice lost a little of their weight for two days. But the next day onwards, they had gained their weight little by little until the end of the observation. At the end of the observation (the 14<sup>th</sup> day of the experiment), the mice had gained their weight during the experiment and their mortality was 0%, which means the mice were not dead at all during the 14 days of observation (Table 6).

Table 6. Mortality Observation of the Mouse Being Given the Ethanol Extracts of *H. sabdariffa* L Calyxes

Gender	Dose (gr/kg weight)	Average Mouse Weight (gr)		Mortality/ Amount of Mice
		Before	After	
Male	15	196.8	212.2	0/5

At the end of the observation, all of the mice were decapitated and their organs were examined macroscopically. The results shows no shape and color abnormality of liver, kidney, lungs, heart, brain and intestines. The result of LD<sub>50</sub> to ethanol extracts

of *H. Sabdariffa* L calyxes is safe and does not change the behavior and activities of the *Sprague-Dawley* mice and LD<sub>50</sub> is heavier than 15 gr/kg weight or practically it is not toxic.

Thus, the fourth hypothesis stating that the ethanol extracts of *H. Sabdariffa* L. calyxes are not toxic to vital animal organs in a short term is proven as LD<sub>50</sub> > 15 gr/kg weight.

### **The Results of Subchronic Toxicity Test**

This test is aimed to determine the safety of a medical accumulation. The use of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes is given orally to *Sprague-Dawley* mice. The examination is done according to OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) *Guidelines for Testing of Chemical Section 4, Health Effects, 1981*). In Subchronic Toxicity test. the ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes are given orally using stomach sonde in the form of liquid under 1% weight per serving.

The researcher used 40 male and female, aged 2-3 months old and weighed around 140-180 grams. The mice were divided into 4 groups randomly and each group consisted of 10 mice, 5 males and 5 females. The 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, and 3<sup>rd</sup> *Sprague-Dawley* mice groups had the ethanol extracts from *H. sabdariffa* L calyxes and the 4<sup>th</sup> group as the control. Then, the mice were acclimatized for 7 days in the laboratory by being given standard drink and meal sufficiently. During the experiment, they had sufficient food and drink, except 17-20 hours before the examination. At that time, the mice had to be fasted and were only given some water to drink.

The ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes were given with the dose of 1.25 gr/ kg weight, 2.5 gr/ kg weight, and 5 gr/ kg weight. The 1<sup>st</sup> group were given the ethanol extracts with the dose of 1.25 gr/ kg weight. The 2<sup>nd</sup> group were given the ethanol extracts with the dose of 2.5 gr/ kg weight. The 3<sup>rd</sup> group were given the ethanol extracts with the dose of 5 gr/ kg weight. The 4<sup>th</sup> group as the control.

The ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. were given to the mice in 30 days. The observation was done during 30 days including weighing the mice every day, observing the changes of their behavior and clinical symptoms. At the end of the decapitation test, blood sampling was taken to examine hemoglobin, leucocyte,

SGOT, SGPT, creatinine and ureum. Some macroscopic and microscopic tests towards vital organs like liver, kidney, lungs, heart, brain and intestines.

The results of subchronic toxicity test are as follow: The observation of male and female *Sprague-Dawley* mice for 30 days in all groups do not show any abnormality. There is no mortality of the mice, either to those which were given the ethanol extracts or the ones as the control. From the observation, generally there is no different behavior between the tested group and the controlled group. The results of the observation can be seen in Table 7.

Table 7. The Average Weights of the Mice (gram,  $\bar{x} \pm SD$ )

Gender Groups	Day	Control ©	Ethanol Extracts of <i>H. sabdariffa</i> L Calyxes			p Inter
			dose 1.25 gr/kg weight	dose 2.5 gr/kg weight	dose 5 gr/kg weight	
Male	1	150.4±11.82	150.4±13.41 (p=1.00)	150.8±15.52 (p=1.00)	153.2±17.13 (p=0.993)	0.98
	30	184.8±17.95	199.2±14.99 (p=0.68)	188±16.87 (p=0.994)	198±21.83 (p=0.740)	0.62
Female	1	187.2±16.90	158.8±19.49 (p=1.00)	146.4±11.89 (p=0.655)	157.2±18.48 (p=0.995)	0.58
	30	187.2±16.90	184±18.54 (p=0.993)	174±8.09 (p=0.677)	182±19.91 (p=0.970)	0.74

P inter group ( $p > 0.05$ ): insignificant weight differences of male and female mice in the 1<sup>st</sup> and 30<sup>th</sup> day ( $p > 0.05$ ). At the probability of *post hoc* (p value), the treatment of each group is compared with the control group and it is not significant ( $p > 0.05$ ).

The results of Hemoglobin and leucocyte can be seen in Table 8.

Tabel 8. The Average Value of Hb and Leucocyte ( $\bar{x} \pm SD$ ) of Male and Female Mice After Being Given Ethanol Extracts of *H. sabdariffa* L Calyxes

Parameter		Control (C)	Ethanol Extracts of <i>H. sabdariffa</i>			Sig
			dose 1.25g/kg	dose 2.5g/kg	dose 5 g/kg	
Hb	Male	14.08±0.20	13.74±0.69 (p=0.421)	13.88±0.65 (p=1.000)	13.72±0.44 (p=0.310)	0.76
(g%)	Female	14.08±0.27	13.68±0.65 (p=0.548)	13.96±0.34 (p=0.690)	14.24±0.44 (p=0.69)	0.71
Leuco- cyte ( $\Sigma/mm^3$ )	Male	17.160±512	16.760±941 (p=0.690)	17.600±565 (p=0.310)	20.360±898 (p=0.08*)	0.01***
	Female	17.960±344	17.560±542 (p=0.310)	17.480±652 (p=0.222)	19.460±140 (p=0.03*)	0.03***

\*p < 0.05 higher than control

\*\*\*p < 0.05 inter group differences

In Table 8 there are no significant differences in the examination of Hb among inter groups and between these groups with the control group ( $p > 0.05$ ). This applies to either male and female mice. In the leucocyte examination, there is a tendency that the greater the dose of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes is, the higher the leucocyte is. The average leucocyte of the groups of the mice which are given the ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes is 5 gr/ kg weight higher than the control group, either to male and female mice. And it is statistically significant ( $p < 0.05$ ).

The results of blood examination like SGOT, SGPT, creatinine and urea as shown in Table 9.

Table 9. The Influence of Various Ethanol Extracts of *H. sabdariffa* L. Calyxes Doses ( $x \pm SD$ ) to Blood Examination of the Mice

Parameter	jenis kelamin	Control (C)	Ethanol Extracts of <i>H. sabdariffa</i>			p Inter
			dose 1,25g/kg	dose 2,5g/kg	dose 5 g/kg	
Groups						
SGOT (U/L)	male	73.17 $\pm$ 7.93	76.72 $\pm$ 4.31 (p=0.548)	76.67 $\pm$ 2.77 (p=0.69)	76.91 $\pm$ 5.08 (p=0.69)	0.648
	female	72.27 $\pm$ 5.67	77.86 $\pm$ 4.44 (p=1.00)	76.09 $\pm$ 4.22 (p=0.564)	75.39 $\pm$ 4.62 (p=0.69)	0.730
SGPT (U/L)	male	31.91 $\pm$ 7.92	31.06 $\pm$ 0.77 (p=0.222)	30.88 $\pm$ 9.65 (p=0.342)	29.39 $\pm$ 5.82 (p=0.347)	0.586
	female	30.39 $\pm$ 3.52	30.27 $\pm$ 2.87 (p=0.324)	29.22 $\pm$ 4.95 (p=0.352)	28.69 $\pm$ 0.88 (p=0.365)	0.815
Ureum (mg%)	male	21.93 $\pm$ 2.57	21.86 $\pm$ 0.62 (p=0.222)	20.99 $\pm$ 2.62 (p=0.346)	22.11 $\pm$ 1.22 (p=0.62)	0.796
	female	21.63 $\pm$ 1.05	21.72 $\pm$ 1.8 (p=0.222)	21.13 $\pm$ 1.37 (p=0.421)	21.82 $\pm$ 3.94 (p=0.387)	0.936
Kreatinin (mg%)	male	0.43 $\pm$ 0.10	0.43 $\pm$ 0.10 (p=0.222)	0.43 $\pm$ 0.03 (p=0.222)	0.43 $\pm$ 0.02 (p=0.256)	0.997
	female	0.47 $\pm$ 0.11	0.46 $\pm$ 0.10 (p=0.222)	0.45 $\pm$ 0.04 (p=0.356)	0.44 $\pm$ 0.03 (p=0.326)	0.656

SGOT, SGPT, Ureum and Creatinine either to male and female mice are not different significantly ( $p > 0,05$ ) among inter groups or between these groups with the control group.

The examination of vital organs can be seen in Table 10.

Table 10. The Weight of the Organs per 100 gr Weight of Male and Female mice (x±SD)

Organ	Gender	Control (C)	Group Treatment / doses			p inter groups
			1,25gr/kg	2,5gr/kg	5 gr/kg	
Liver	Male	5.06±0.80	4.60±0.61 (p=0.548)	4.56±0.54 (p=0.310)	5.06±0.78 (p=1.000)	0.514
	Female	4.86±0.44	4.13±1.02 (p=0.151)	3.84±0.44 (p=0.32)	4.19±0.79 (p=0.95)	0.103
Kidney	Male	1.25±0.16	1.29±0.26 (p=0.690)	1.20±0.15 (p=0.548)	1.26±0.20 (p=0.841)	0.832
	Female	1.11±0.05	1.11±0.11 (p=0.841)	1.05±0.06 (p=0.095)	1.16±0.13 (p=0.548)	0.272
Lungs	Male	1.32±0.15	1.25±0.10 (p=0.421)	1.31±0.11 (p=1.000)	1.18±0.10 (p=0.151)	0.168
	Female	1.23±0.04	1.21±0.27 (p=0.690)	1.18±0.14 (p=0.411)	1.24±0.07 (p=0.841)	0.785
Spleen	Male	0.47±0.06	0.41±0.04 (p=0.095)	0.47±0.12 (p=0.690)	0.45±0.08 (p=0.841)	0.590
	Female	0.48±0.06	0.41±0.08 (p=0.151)	0.35±0.02** (p=0.005)**	0.48±0.13 (p=0.841)	0.062
Heart	Male	0.55±0.04	0.58±0.10 (p=0.841)	0.56±0.04 (p=1.000)	0.50±0.05 (p=0.310)	0.798
	Female	0.62±0.08	0.54±0.17 (p=0.421)	0.47±0.04** (p=0.05)**	0.62±0.10 (p=0.841)	0.095
Brain	Male	1.56±0.04	1.52±0.10 (p=0.690)	1.58±0.08 (p=0.841)	1.53±0.06 (p=0.690)	0.814
	Female	1.49±0.17	1.44±0.10 (p=0.310)	1.47±0.08 (p=0.548)	1.57±0.07 (p=0.421)	0.190
Intes- tines	Male	10.52±1.90	10.21±0.74 (p=1.00)	9.51±1.02 (p=0.421)	12.01±2.22 (p=0.310)	0.224
	Female	11.20±0.68	10.38±2.20 (p=0.690)	8.50±0.60** (p=0.05)**	11.20±1.93 (p=1.00)	0.041*

\*p < 0.05 more than control

\*\*p < 0,05 less than control

\*\*\*p < 0,05 there are significant differences in inter groups

Table 10. shows that the average weights of liver, kidney, lungs, spleen, heart, brain and intestines of the male mice are not significantly different in inter treated groups and the control group, or the comparison between the inter treated groups and control group which is not significantly different as well ( $p > 0.05$ ). Whereas, the average weights of liver, kidney, lungs, and brain of the female mice are not significantly different among the treated groups and control group, or even the comparison between the inter treated groups with control group which are not significantly different ( $p > 0.05$ ), except the weights of spleen, heart and intestines of the female mice which are less than the control group as they are significantly different ( $p < 0,05$ ).

### The Macroscopic and microscopic Observation of the Organs

In the group control, the macroscopic observation does not show abnormal sizes or shapes as well as their elasticity which is normal. Most of the treated groups do not have any abnormal sizes or shapes, and the weights of the organs are less than the control group.

In histopathology, there are no specific abnormality especially liver and kidney. Almost all livers of the mice in all groups show no specific abnormality, except a mouse with the dose of 2.5 gr/ kg weight at which it is found sinusoid dilatation and two mice of the control which experience a little sinusoid dilatation; but it is still under normal limitation. The hispathology observation of *Sprague-Dawley* livers in Figure 11. shows no specific abnormality.

Most kidneys of the mice in groups with the doses of 1.25 gr/ kg weight. 2.5 gr/ kg weight and 5 gr/ kg weight as well as in the control group show no specific abnormality. Only in a few mice, it is found tubulus dilatation and a little tubulus necrosis in cortex but they are still in normal limit. This condition is not only found in the treated groups but also in the control group. The results of the histopathology observation of the *Sprague-Dawley* male and female kidneys can be seen in Figure 12.

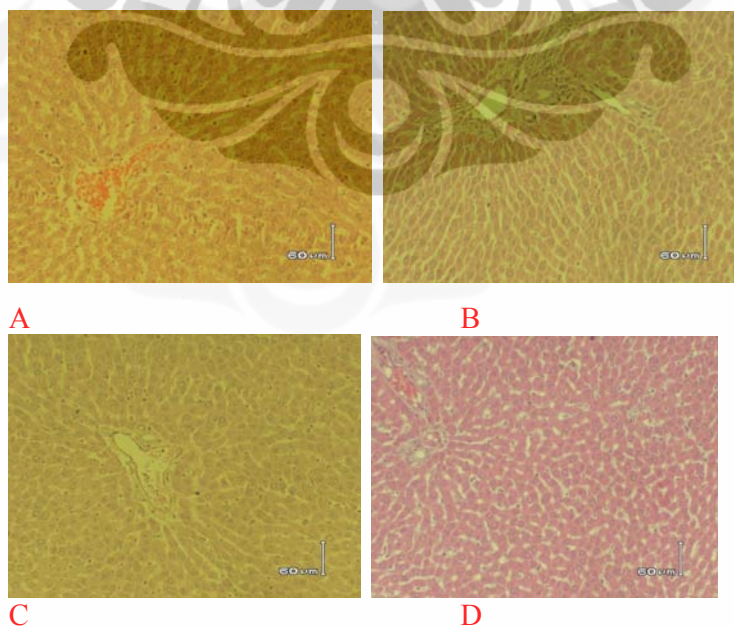


Figure 11: Microscopic Liver of Male and Female Mice. A) Control Group; B) Group with the Dose of 1.25 gr/ kg Weight; C) Group with the Dose of 2.5 gr/ kg Weight; D) Group with the Dose of 5 gr/ kg Weight. All liver organs seem to be normal; there is no specific abnormality



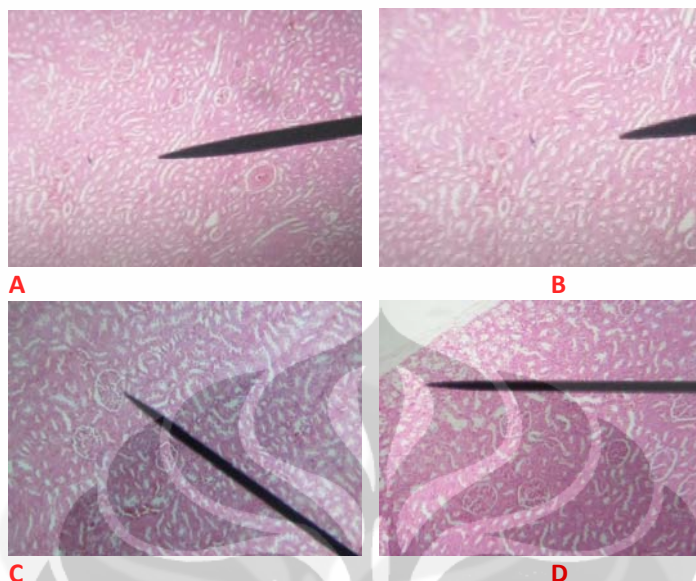


Figure 12: Microscopic Kidney of Male and Female Mice. A) There is a normal tubulus cell in the control group. B) There is a normal tubulus cell in the group with the dose of 1.25 gr/ kg weight; C) There is a glomerulus normal cell in the group with the dose of 2.5 gr/ kg weight; D) there is a little tubulus dilatation in the cortex in the group with the dose of 5 gr/ kg weight but it is still in normal limit.

Thus, the 5<sup>th</sup> hypothesis has been proven that the ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes are not toxic to mice vital organs in a long term.

### Cytotoxicity Test

The test is done to find the cytotoxicity of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes to epithelial and fibroblast cells. The effects of the ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes to epithelial and fibroblast cells are determined according to MTT test and stated in percentages of viability cells towards control. The average absorbance value (OD) of every group is taken and calculated based on the standard deviation in the same concentration groups. The absorbance value is stated in percentage towards the control group as viability cells. The absorbance and viability epithelial cells can be seen in and Figure 13.



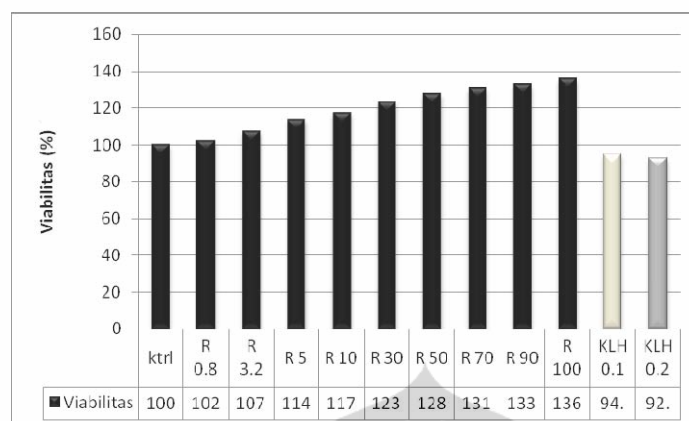


Figure 13. Viability Chart (%) of Epithelial Cells in Various Concentrations of Ethanol Extracts of *H. sabdariffa* L Calyxes in 24 Hours

R = *H. sabdariffa* 0,8% -100%      Ktrl = control cells      KLH= Clorhexidine

Viability of epithelial cells in treated groups increases equal with the increasing concentration; and the viability is higher in control group (100%). While the viability in control group is positive as chlorhexidine 0.1% (94.87%) and 0.2% (92.79%) have less viability than the control (100%). All treated groups of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes have higher viability compared with those positive control groups chlorhexidine 0.1% and 0.2%.

It shows that the highest viability percentage is in treated groups with 100% concentration, and it decreases according to the less given concentration. Whereas the lowest viability percentage is in the positive control group chlorhexidine 0.1% (94,87%) and 0,2% (92,79%). The pictures of control epithelial cells after given ethanol extract of *H. sabdariffa* L calyxes 50% treated cells and 100% treated cells and chlorhexidine shown with *inverted Zeiss* microscope (Figure 14. A-D) are as below.

Cytotoxy of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes to fibroblast cells is determined according to cell viability in percentated toward control. The value of absorbance and fibroblast cells viability can be seen in Figure 15. The figure of fibroblast cell in control group and treated groups can be seen in as below.

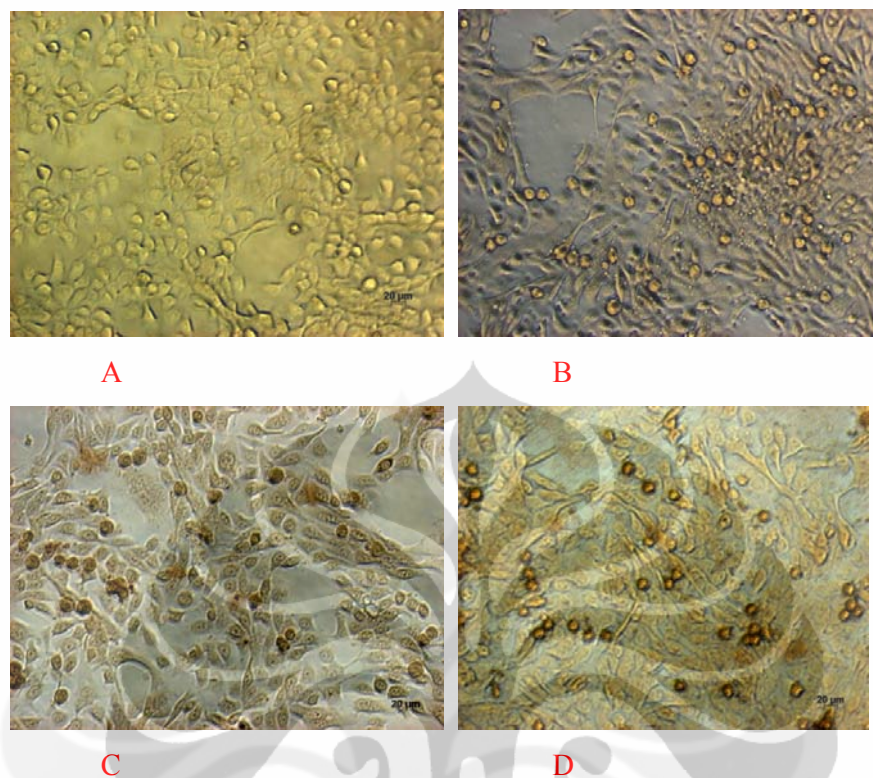


Figure 14. Microscopic Epithelial Cells: A) Control group; B) After given chlorhexidine (100X expansion); C) After given *H. sabdariffa* 50% (100x expansion); D). After given *H. sabdariffa* 100% (100x expansion).

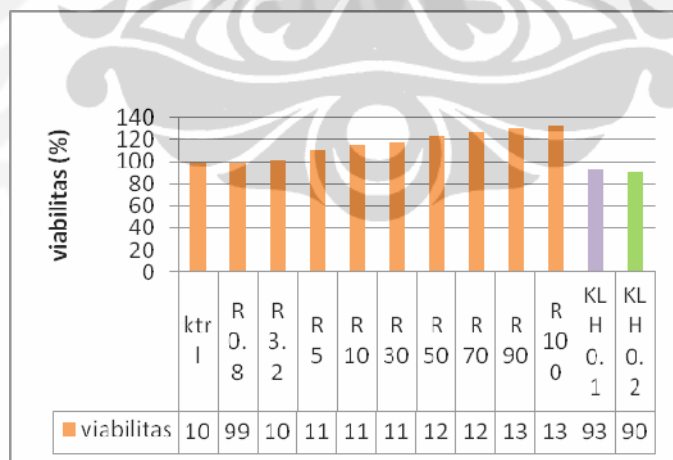


Figure 15. Viability Chart (%) of Fibroblast Cells After Given Various Concentrations of Ethanol Extracts from *H. sabdariffa* L. Calyxes

Ktrl : control, R : Extracts of *H. sabdariffa*, KLH : chlorhexidine

Viability of primer fibroblast cells in treated groups is higher than the untreated group (100%), except in treated group of 0.8%. While in positive control group of chlorhexidine 0.1% and 0.2%, the viability is less than those of untreated groups (100%).

It shows that the highest viability percentage is in treated group with concentration of 100% and it decreases according to the decreased concentration given. While the lowest viability percentage is in positive control group of chlorhexidine 0.1% (92,52%) and 0,2% (90.36%). The pictures of control of cells, ethanol extract of *H. sabdariffa* L. calyxes 50% treated cells, and ethanol extract of *H. sabdariffa* L. calyxes 100% treated cells shown with *inverted Zeiss* microscope (Figure 16. A-D)

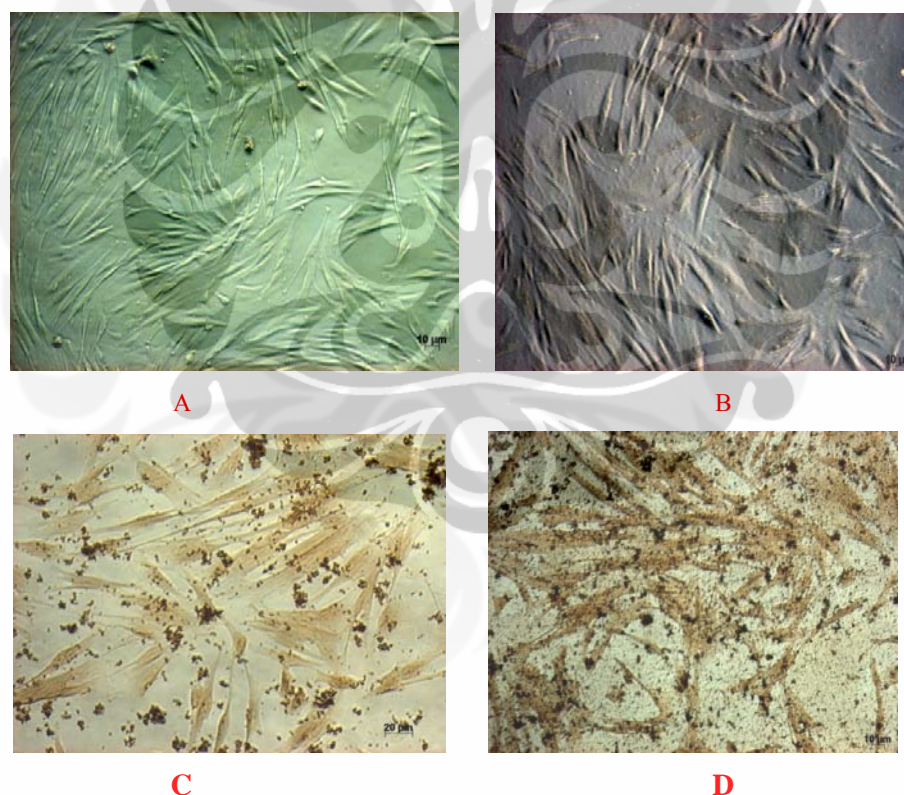


Figure 16. Microscopic Fibroblast Cells; A) Control group (100x expansion); B) Chlorhexidine treated cells (100x expansion); C) *H. sabdariffa* 50% treated cells (200x expansion); D). *H. sabdariffa* 100% (200x expansion).

Thus, the 6<sup>th</sup> hypothesis has been proven that ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes are safe and not toxic to epithelial and fibroblast cells.

### **Biofilm Test**

In the first orientation, *S. sanguinis* suspension is diluted from  $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ . The results of bacteria cultivation with concentration  $10^{-1}$  to  $10^{-6}$  is difficult to count because of the colony density. The result of bacteria cultivation with concentration of  $10^{-6}$ , the colony density has decreased and been easy to count. But in the result of bacteria cultivation with dilution of  $10^{-7}$  to  $10^{-8}$ , the colony grows very little. So in this research, bacteria dilution is determined with  $10^{-6}$  dilution as to fulfil the criteria that it must not be too dense and can be counted. The average amount of the colony in  $10^{-6}$  dilution is 636 CFU/mL. The result of biofilm test towards the potency of *S. sanguinis* formation in adherence biofilm phase can be seen in Figure 17. While, the formation in maturation biofilm phase can be seen in Figure 18.

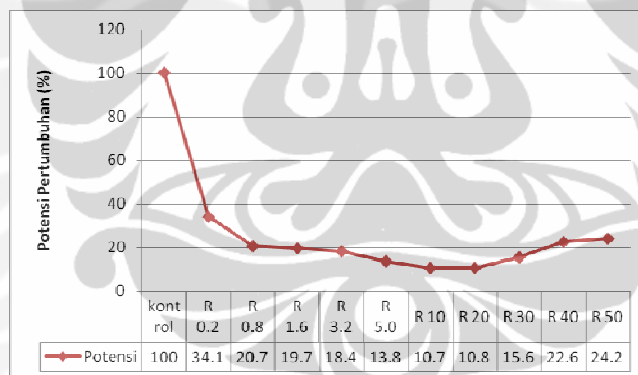


Figure 17. The Potency of *S. sanguinis* Biofilm Formation in Adherence Biofilm Phase (20 hours)



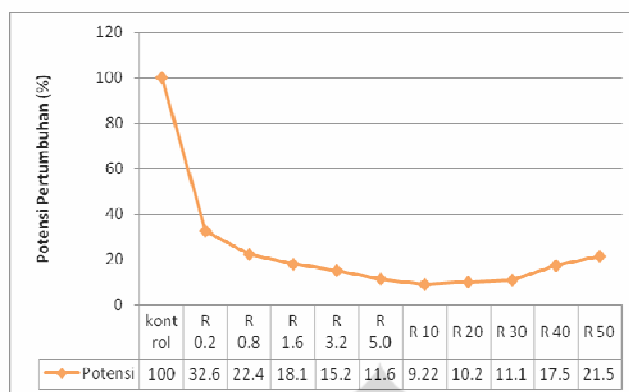


Figure 18. The Potency of *S. sanguinis* Biofilm Formation in Maturation Phase (24 hours)

The potency of *S. sanguinis* in biofilm 20 hours in ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces is lower than the negative control group. The average OD in positive control group of chlorhexidine 0.1% (20.47%) is equal with the groups of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces which is 0.8 (20.75%) and it is not significantly different ( $p > 0.05$ ). The average OD of chlorhexidine 0.2% (10.66%) is equal with the groups of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces whose concentration is 10% (10.73%), it is not significantly different ( $p > 0.05$ ), and 20% (10.80%) which is not significantly different ( $p > 0.05$ ).

The potency of *S. sanguinis* in biofilm 24 hours in ethanol extracts of *H. sabdariffa* calyces is lower than the negative control group. The average OD in positive control group of chlorhexidine 0.1% (18.47%) is equal with the groups of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces which is 1.6 (18.12%) and it is not significantly different ( $p > 0.05$ ). The average OD of chlorhexidine 0.2% (9.26%) is equal with the groups of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces whose concentration is 10% (9.22%), it is not significantly different ( $p > 0.05$ ).

Thus, the 7<sup>th</sup> hypothesis has been proven as the ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces can slow down the potency of *S. sanguinis* growth in biofilm and the antibacteria effectiveness of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyces in slowing down the potency of *S. sanguinis* formation is equal with chlorhexidine in biofilm test.

## CONCLUSIONS AND SUGGESTIONS

### CONCLUSIONS

After some phases of the research, it has been proven the followings:

1. The ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes consist of phenol, flavonoid, tannins and saponin which function as antibacteria.
2. The standard parameter of ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes can be determined.
3. The ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes have antibacteria effects to *S.sanguinis* in concentration of 0.78%.
4. The ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes are safe and not toxic based on acute toxicity test.
5. The ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes are safe and not toxic based on sub chronic toxicity test.
6. The ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes is not toxic to epithelial cells and fibroblast based on *MTT assay* test.
7. The ethanol extracts of *H. sabdariffa* L. calyxes can slow down the potency of *Streptococcus sanguinis* growth in biofilm.

### SUGGESTIONS

Based on the results of the research, the researcher propose the followings suggestion :

1. It needs further research to find appropriate form of prepare to be used in oral cavity, especially to cure gingivitis.
2. It needs further research to know whether hard tissues, like email hardness change as well as the characteristic of colour absorbance of ethanol extracts of *H. sabdariffa* calyxes.
3. It needs further research of the effects of ethanol extracts of *H. sabdariffa* to cure gingivitis in *in vivo*, continued with clinical test.
4. It needs further development to make *H. sabdariffa* as phytopharmaca through clinical test and chronic safety test.

5. It is hoped to cooperate with pharmacy companies to produce *H. sabdariffa* extracts.
6. It is hoped that the results of this research can be registered to get Intellectual Property Rights or *Hak Atas Kekayaan Intelektual (HAKI)* and scientific international publication.



## DAFTAR PUSTAKA

1. Bergenholtz A. dan Jorkjend L. Some Modern Aspects of Periodontal Disease. *SDS Journal* 1990; 4(2):156-164.
2. American Academy of Periodontology. Position Paper Periodontal Disease of Children and Adolescents. *J Periodontol* 2003; 74 : 1696-1704.
3. Camargo GA, Silveria CE, Fortes TN, Silva A, Silva C. Periodontal Health Status and Prevalence of Root Caries in Brazilian Adults of Aracaju City. *JDOH* 2010; 2(3): 23-26
4. Zhang J, Xuan D, Fan W, Zhang X dkk. Severity and Prevalence of Plaque-Induced Gingivitis in the Chinese Population. *Compend Contin Educ Dent.* 2010; 31: 8: 1-8.
5. American Academy of Periodontology. Position Paper Epidemiology of Periodontal Disease. *J Periodontol* 2005;76:1406-1419.
6. Aninomos. *Profil Kesehatan Gigi dan Mulut di Indonesia pada Pelita VI.* Direktorat Jenderal Pelayanan Medik, Direktorat Kesehatan Gigi. DepKes RI 1999: 18
7. Wu H, Mintz P, Ladha M, Fives-Taylor PM. Isolation and Characterization of Fap1, A Fimbriae-associated Adhesion of *Strep parasanguis* FW213. *Mol Microbiol* 1998;28:487-500.
8. Ge X, Kitten T, Chen Z, Lee SP, Munro CL, Xu P. Identification of *Streptococcus sanguinis* Genes Required for Biofilm Formation and Examination of Their Role in Endocarditis Virulence. *Infect immun* 2008; 76(6): 2551-9.
9. Marsh PD dan Martin MV. *Oral Microbiology.* 4<sup>th</sup> ed. Edinburgh : Elsevier. 2009: 74-100.
10. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial Mechanism in The Pathogenesis of Destructive Periodontal Disease : A critical Assessment. *J. Period Res* 1991;26:195-212.
11. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. *Microbiology* 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia : JB lippincott.1990: 71-80.
12. Kriswandini IL. Bakteri *Streptococcus sanguis* Sebagai Fasilitator *Streptococcus Mutans* yang Berperan Dalam Pathogenesis Karies Gigi. *Maj. Ked. Gigi (dent J). Ed khusus Timnas IV* 11-13 Agustus 2005: 247-251.
13. Quirynen M, Soers C, Desnyder M, Dekeyser C, Pauwels M, van Steenberghe D. A 0.05% Cetyl Pyridinium Chloride/ 0.05% Chlorhexidine Mouth Rinse During Maintenance Phase After Initial Periodontal Therapy. *J Clin Periodontol* 2005; 32(4): 390-400.



14. Olatuji LA, Adebayo JO, Oguntoye OB, Olatunde NO, Olatujni VA, Soladoye AO. Effects of Aqueous Extracts of Petals of Red and Green Hibiscus sabdariffa on Plasma Lipid and Hematological Variables in Rats. *Pharmaceutical Biology*. 2005; 43:471-474.
15. Situmorang N. Profil Penyakit Periodontal Penduduk di Dua kecamatan Kota Medan Tahun 2004 Dibandingkan Dengan Kesehatan Mulut tahun 2010 (WHO). *Dentika Dental Journal* 2003; 2(9):71-77.
16. Suwandi T. *Efek Antibakteri dari Infusum Kelopak Hibiscus sabdariffa terhadap Streptococcus sanguinis (in vitro)*. Perpustakaan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. 2010.



## DAFTAR RIWAYAT HIDUP

### DATA PRIBADI

Nama : drg. Trijani Suwandi, Sp.Perio

Tempat/tanggal lahir : Surakarta, 12 September 1969

Agama : Katholik

Pekerjaan : Staf Pengajar Departemen Periodonti  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

Alamat Kantor : Jalan Kyai Tapa, Jakarta Barat

Alamat Rumah : Citra Garden 1A Blok AD-2/ 15, Jakarta Barat

Nama suami : Ir. Kurnia Wibowo

Nama Anak : Cynthia Kartika, James Sebastian

Nama Ayah : Wen Kuang Ling

Nama Ibu : Hoo Joe Tien

### RIWAYAT PENDIDIKAN

1988 : Lulus Sekolah Menengah Atas Santo Yoseph, Solo, Jawa Tengah

1993 : Lulus sebagai dokter gigi dari FKG Universitas Trisakti – Jakarta

2003 : Lulus sebagai dokter gigi Spesialis Periodonsia FKG Universitas Indonesia

### Pengalaman Pekerjaan :

1993 – sekarang : Tenaga Edukatif Tetap Bagian Periodonti FKG Universitas Trisakti – Jakarta

2003 – sekarang : Praktisi di Klinik Spesialistik Periodonti Rumah Sakit Gigi dan Mulut Trisakti

2010 – sekarang : Praktisi di Department Bedah Mulut RS Siloam Kebun Jeruk

2005 – 2006 : Kepala Departemen Periodonsia FKG Universitas Trisakti

2006 – sekarang : Pengajar Sekolah Dental Implant FKG Universitas Trisakti

Universitas Indonesia

2012 – sekarang : Ketua Persatuan Dokter Gigi cabang Jakarta Barat periode 2011-2014.

### **SIMPOSIUM / SEMINAR / PANITIA**

<b>No.</b>	<b>Kegiatan</b>	<b>Sifat / Peranan</b>	<b>Tahun</b>
1.	Simposium Implan-Periodontik (FKG Trisakti)	Panitia	17 Januari 1995
2.	Seminar Penatalaksanaan Masalah Periodontal Saat ini (FKG UI)	Peserta	4 April 1995
3.	Penataran Metodologi Pengabdian Kepada Masyarakat dan Penulisan Lap PKM sebagai Karya Tulis Ilmiah. FKG Usakti	Peserta	13-16 Juli 1998
4.	Pendidikan Berkelanjutan Bidang Studi Periodonti FKG Usakti.	Panitia	26 Juli–6 Agus 99
5.	Kursus Ketrampilan Singkat Periodontik. Forum Ilmiah VI-1999.	Pembicara	22-24 Nov 1999
6.	Pendidikan Pelatihan Perawat Gigi dalam bidang Periodontik	Pembicara	24-28 Jan 2000
7.	The 12 th Scientific Meeting and Refresher Course in Dentistry. FKG UI	Peserta	22-25 Nov 2000
8.	Pelatihan Petugas Proteksi Radiasi FKG UI Jakarta 9-11 Agustus 2001	Peserta	11 Agus 2001
9.	Kursusu Enhancement of Esthetic Outcomes via Periodontal Plastic Surgery. Foril II FKG Trisakti	Peserta	24-26 Okt 2002
10.	A Practical Way (direct technique) in Overcoming Gingival Recession by Temporary Artificial Gingiva. Foril VII	Peserta	24-26 Okt 2002
11.	Hands on Periodontik. Fokus Trisakti	Pembicara	21-23 Agust 2003
12.	Simposium Mini “ Sosialisasi dan Pembahasan Periodontologi Klinik untuk Praktis”. FKG UI.	Peserta	30 Agust 2003
13.	The 13 th Scientific Meeting and Refresher Course in Dentistry. FKG UI	Peserta	22-25 Nov 2003

14. Live Surgical Using Endopore Implant” FKG Usakti.	Peserta	13 Des 2003
15. Integrated Periodontics Seminar” FKG Usakti	Panitia	21 Peb 2004
16. Fokus Kursus FKG Usakti	Pembicara	19-21 Agus 2004
17. Kursus life surgery bonegrat	Pembicara	19-21 Agus 2004
18. Integrated Lecturer Foril VIII FKG Usakti	Pembicara	7-9 Juli 2005
19. Kursus “ Important Factors in Treat- ment to Achieve Successful Implant Treatment “Foril VIII FKG Usakti.	Peserta	7-9 Juli 2005
20. “Perawatan Infeksi Periodontal dengan Antimikroba Lokal”.	Penceramah	23 Juli 2005
21. Kursus “Implant Placement and Pros- thetic Procedure Nobel Replace tapered and Nobel Direct” (Timur).	Peserta	12-13 Nov 2005
22. Peserta rekualifikasi Petugas Proteksi radi- sasi Bidang diagnostik. Badan Pengawas Tenaga Nuklir.	Peserta	13-14 Des 2005
23. Peserta Kursus Subgingival Debride- ment : the Use of hand Instruments and or Ultrasonic System”. PITEKGI III FKG Moestopo.	Peserta	8-10 Mar 2006
24. Osstem Annual Meeting”. Seoul, Korea	Peserta	7-10 April 2006
25. Seminar “ Implant Prosthodontics” FKG Usakti	Peserta	13-14 Mei 2006
26. Seminar pada Lustrum IV FKG UNMAS kolaborasi dengan Aesthetic in Bali	Pembicara	19-21 Mei 2006
27. Modern Dentistry PDGI Jakarta Utara Kelapa Gading. Jakarta	Pembicara	10-11 Juni 2006.
28. Seminar sehari PDGI Kalimantan Barat	Pembicara	17 Juni 2006
29. KSFB+ KSK Forum Kursus FKG Usakti.	Pembicara	10-12 agus 2006

- |  |           |                 |
|--|-----------|-----------------|
| 30. The 1 <sup>ST</sup> meeting of Basic science to Im-plantology and Dental Implantology Study Group PDGI Pengwil DKI Jakarta.                              | Pembicara | 23 Sept 2006    |
| 31. Orthodontic course “ The Use of Mini Srew Implants for Orthodontics Anchorage in the Straight Low friction system” PDGI Jakarta Barat. 8-9 November 2006 | Peserta   | 8-9 Nov 2006    |
| 32. Dentistry 2006 PDGI Jakarta Barat.   | Pembicara | 10-11 Nop 2006  |
| 33. 29 <sup>th</sup> Asia Pacific Dental Congress.   | Pembicara | 25-29 Nop 2007. |
| 34. KSFB dan KSK Fokus 2007 FKG Universitas Trisakti.  | Pembicara | 1-3 Nov 2007    |
| 35. Seminar BEM FKG Usakti   | Pembicara | 23-24 Nov 2007  |
| 36. Kursus ketrampilan Grand Dentistry Indonesia 2007. Gelora Bung Karno   | Pembicara | 2 Des 2007      |
| 37. Pertemuan Ilmiah Nasional Ilmu Kedokteran Gigi Terapan Klinik ke-2. PB PDGI  | Pembicara | 25-26 Jan 2008  |
| 38. The 10 <sup>th</sup> National Congress of Indonesian Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (Ina-AOMS). Semarang.                                | Pembicara | 1-3 Pebr 2008   |
| 39. 2 days Implant Seminar Training Course. (Nobel Biocare) PABMI Jakarta.   | Peserta   | 8-9 Maret 2008  |
| 40. Kongres PDGI XXIII. Surabaya.  | Pembicara | 19-22 Mar 2008  |
| 41. The Nobel Biocare World Tour 2008. Singapura   | Peserta   | 27-29 Apr 2008  |
| 42. ISID Surabaya  | Fellow    | 28-29 nov 2008  |
| 43. Ceramah Ilmiah International Dies Natalis ke-61 FKG UGM. Yogyakarta  | Peserta   | 5-6 Des 2008    |
| 44. Seminar PDGI Sukabumi  | Pembicara | 13 Des 2008     |
| 45. Seminar PDGI Tangerang RS Siloam Lipokarawaci 14 Pebruari 2009   | Pembicara | 14 Pebr 2009    |
| 46. Temu Ilmiah Nasional (TIMNAS) V FKG Unair. Surabaya  | Pembicara | 20-22 Feb 2009  |

47. Seminar Dentistry Plus II 2009. PDGI Jakarta Barat.	Pembicara	19 April 2009
48. Slide lecture dan hands on Forum Kursus FKG Trisakti.	Pembicara	1-3 Juli 2009
49. Seminar PDGI Pakan Baru	Pembicara	25-26 Juli 2009
50. ISID. Bogor	Panitia	15-16 Agust 2009
51. KPPIKG. FKG UI	Pembicara	14-17 Okt 2009
52. Grand Implant Dentistry	Pembicara	22-14 Jan 2010
53. Teeth in an hour live surgerywith nobel replace implant” jakarta	Peserta	20 Peb 2010
54. Seminar PDGI Tegal	Pembicara	18 Apr 2010
55.Kursus Pelatihan Ketrampilan Teknik Laboratorium Biomolekuler (DNA). FKG UI. Jakarta 4-5 Mei 2010.	Peserta	4-5 Mei 2010
56.Seminar RS Panti Wilasa Semarang	Pembicara	7 Mei 2010
57.Pendidikan dan Pelatihan Profesi Kedokteran Gigi Berkelanjutan Program Dental Implantologi Modul I. PABMI.	Pembicara	20-23 Mei 2010
58.Kursus Pelatihan Ketrampilan Teknik Laboratorium Biomolekuler (RNA) FKG UI. Jakarta 1-2 juni 2010.	Peserta	1-2 Juni 2010
59.Kursus Pelatihan Ketrampilan Teknik Laboratorium Biomolekuler (Protein dan Imunologi).	Peserta	24-25 Juni 2010
60.Seminar Grand Fokus FKG Usakti.	Instruktur	6-7 Juli 2010
61.Kursus Pelatihan Ketrampilan Teknik Laboratorium Biomolekular (Kultus Sel dan Jaringan). FKG UI.	Peserta	13-14Juli 2010
62.Seminar sehari PDGI Jakarta Utara.	Pembicara	31 Juli 2010
63.Seminar Solo Dentistry.	Pembicara	6-8 Agus 2010.

- |  |            |                  |
|--|------------|------------------|
| 64. Scientific Meeting “Dentistry Update and Scientific Atmosphere Recent Advance in Dentistry”. Dentisphere. FKG Hang Tuah.                                     | Pembicara  | 15-16 Okt 2010   |
| 65. Seminar Iprosi   | Peserta    | 5-6 Nov 2010     |
| 66. FDI-IDA Joint Meeting Balikpapan   | Pembicara  | 12-14 Nov 2010   |
| 67. National Scientific Seminar In Periodontics 1. New Trend in Periodontics : Treatment Updates, periodontic esthetic and Implant. Surabaya 26-27 Nopember 2010 | Pembicara  | 26-27 Nop 2010   |
| 68. AMED (Advanced Medical Emergency In Dentistry. Jakarta. 11-12 Desember 2010  | Peserta    | 11-12 Des 2010   |
| 69. Peserta Seminar Smart in Surgery with Piezosurgery. PABMI jakarta. 29 januari 2011   | Peserta    | 28 Jan 2011      |
| 70. Seminar BATARA SP. Pengwill Jakarta  | Pembicara  | 18-19 Feb 11     |
| 71. Seminar dentistry plus IV. 2011.   | Penceramah | 29-30 april 2011 |
| 72. Peserta Clinical Periodontal Update. Iperi jakarta   | Peserta    | 5 Juni 2011      |
| 73. Penceramah Grand Implant PABMI   | Penceramah | 9 Juni 2011      |
| 74. Asian Pacific Society of Periodontology.   | Peserta    | 10 Sept 2011.    |
| 75. Implant School trisakti.   | Pembicara  | 15 sept 2011     |
| 76. Foril X. FKG Usakti 6-8 oktober 2011   | Pembicara  | 6-8 Okt 2011     |
| 77. Hands on Reading Dental Research   | Peserta    | 6-8 Okt 2011     |
| 78. Panitia dan Peserta seminar Management of Periodontal Tissue around Prosthesis and Endosseous Implant to Achieve Natural Esthetic Result. IPERI jakarta.     | Peseeta    | 22 Okt 2011      |
| 79. Basic Life Support Training.   | Peserta    | 3 Nov 2011       |
| 80. The 5 <sup>th</sup> Regional Dental Meeting and  | Pembicara  | 11-12 Nov 2011   |

## Exhibition FKG USU. Medan

81.Seminar PDGI Palangkaraya	Pembicara	18-20 Nov 2011
82.Grand Dentistry Indonesia V Pengwil DKI Jakarta	Pembicara	2-3 Des 2011
83.The 2 <sup>nd</sup> Indonesian Symposium of Implant Dentistry	Panitia	10-11 Des 2011
84.Seminar FKG UNSOED Purwokerto	Penceramah	9-10 Mar 2012
85.Seminar PDGI Lampung	Penceramah	16-17 Ma 2012
86.RUA PDGI Jakbar	Penceramah	14 April 2012
87.National Scientific Seminar in Periodontics. IPERI-FKG UNHAS	Penceramah	11-12April2012
88.Seminar RS Pantiwilasa Semarang	Penceramah	26 April 2012

**PUBLIKASI**

1. Suwandi, T. Frenulum yang tinggi penyebab kelainan Periodontal dan Penatalaksanaannya. MIKG th 19. No 57 September 2004.
2. Farizka, I dan Suwandi, T. Pengaruh Penyakit Periodontal pada Kelahiran Bayi Prematur. MI Kedokteran Gigi vol 24, n0. 3 September 2009.
3. Suwandi, T. Endodontic-Periodontal lesions and treatment. Dental Journal. 2010.
4. Suwandi, T. The initial treatment of mobile teeth closure diastema in chronic adult Periodontitis. Jurnal PDGI vol 59, no. 3, Sept-Des 2010. Hlm 105-109.
5. Suwandi, T dan Fatma, D. Biological Activity od Secondary Metabolite Herb in Dentistry. MIKG (submitted Pebruari 2012).
6. Suwandi, T, Suniarti DF, Prayitno SW. Effect of The Ethanol Extract of Hibiscus sabdariffa L. Calyx on *Streptococcus sanguinis* Viability in Biofilm Based on Crystal Violet Assay (in-vitro). **Submitted Journal of Natural Products** ISSN 0163-3864. 11 June 2012. **Reviewed** 15 June 2012.



## PENGHARGAAN

**Juara I Bidang Sari Pustaka** Judul : Management of Peri-Implant Papilla with Papilla Regeneration Technique. National Scientific Seminar In Periodontics 1. New Trend in Periodontics : Treatment Updates, periodontic esthetic and Implant. Surabaya. JW Marriot. 26-27 Nopember 2010

**Juara 3 Bidang Sari Pustaka.** Judul : Pengaruh Penyakit Periodontal pada Kelahiran Bayi Prematur. Dies Natalis Universitas Trisakti. 29 Nopember 2010.

**Juara ke-3 Literature Study Category.** Pepsodent Foril X Award 2011. Foril X 2011 6-8 oktober 2011. **“Biological Activity of Secondary Metabolite Herb in Dentistry”**.

Juara ke-2 kategori Penelitian : **“Antibacterial effect of infusum and ethanol extract *H. sabdariffa* against *S. sanguinis*”**. The 2<sup>nd</sup> National Scientific Seminar in Periodontics. Ikatan Periodonsia Indonesia bekerja sama dengan FKG Universitas Hasanuddin. 11-12 Mei 2012

