


Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* Miers) Terhadap *Escherichia coli* Penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL)

Eka Dinda Wahyuningsih^{a, 1}, Iif Hanifa Nurrosyidah^{b, 2*}

^{a,b} Universitas Anwar Medika, Jl. By Pass Krian KM 33, Sidoarjo, Jawa Timur 61263

*iifhanifanurrosyidah@gmail.com

*korespondensi penulis

INFO ARTIKEL	ABSTRAK
<p>Sejarah artikel: Diterima : 15-10-2022 Revisi : 07-11-2022 Disetujui : 11-11-2022</p> <p>Kata kunci: Antibakteri <i>Cyclea barbata</i> Miers Daun Cincau Hijau <i>E.coli</i> ESBL</p>	<p>Infeksi merupakan penyakit yang paling banyak dijumpai di negara tropis seperti Indonesia. Penggunaan antibiotic yang tidak rasional dapat menimbulkan resistensi bakteri. Bakteri resisten yang paling sering dijumpai adalah <i>Escherichia coli</i> <i>Extended Spectrum Beta Lactamase</i> (<i>E.coli</i> ESBL). Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa aktivitas antibakteri dan pengaruh perbedaan konsentrasi pada ekstrak daun cincau terhadap <i>E. coli</i> ESBL. Penelitian ini menggunakan simplisia daun cincau yang di ekstrak secara maserasi menggunakan pelarut etanol yang diperoleh ekstrak pekat kemudian diuji fitokimia untuk mengetahui kandungan yang berpotensi sebagai zat antibakteri. Uji antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram dengan varian konsentrasi 50%, 75% dan 100%. Berdasarkan hasil yang diperoleh ekstrak daun cincau memiliki aktivitas antibakteri dengan rata-rata II mm pada konsentrasi 50%, 16 mm pada konsentrasi 75% dan 21 mm pada konsentrasi 100%. Serta memiliki pengaruh dengan nilai koefisien determinasi R Square sebesar 0,999 atau 99,9%.</p>
<p>Key word: Antibacteria <i>Cyclea barbata</i> Miers Green grass jelly leaves <i>E.coli</i> ESBL</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>Infection is the most common disease in tropical countries such as Indonesia. Irrational use of antibiotics can lead to bacterial resistance. The most common resistant bacteria encountered was <i>Escherichia coli</i> Extended Spectrum Beta Lactamase (<i>E.coli</i> ESBL). This study aimed to analyze the antibacterial activity and the effect of different concentrations of grass jelly leaf extract on <i>E. coli</i> ESBL. This study used grass jelly leaf simplicia which was extracted by maceration using ethanol as a solvent obtained from the extract and then phytochemicals to determine the content tested as an antibacterial agent. Antibacterial test was carried out using paper disc diffusion method with concentration variations of 50%, 75% and 100%. Based on the results obtained, grass jelly leaf extract has antibacterial activity with an average of 11 mm at a concentration of 50%, 16 mm at a concentration of 75% and 21 mm at a concentration of 100%. And has an influence with the coefficient of determination R Square of 0.999 or 99.9%.</p> <p>This is an open access article under the CC-BY-SA license</p> 

Pendahuluan

Infeksi merupakan suatu masalah yang sering dijumpai dalam kehidupan sehari-hari. Infeksi merupakan suatu keadaan adanya mikroorganisme pada jaringan tubuh yang disertai gejala klinis baik bersifat lokal maupun sistemik. Salah satu penyebabnya adalah mikroorganisme bakteri patogen yang dapat menghasilkan enzim β -lactamase atau yang

disebut dengan *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL).

Penelitian yang dilakukan oleh Pajirau tahun (2010) menyatakan bahwa bakteri penghasil ESBL banyak dijumpai pada golongan *Enterobacteriaceae* dan mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan β -lactams (Pajirau, 2010). Selain menyebabkan resistensi antibiotik β -lactams, ESBL juga mampu menyebabkan resistensi multidrug pada beberapa antimikroba lainnya seperti monobaktam, aminoglikosida,

fluroquinolon, tetrasiklin, kloramfenikol, sulfonamid, dan ko-trimoksazol (Michael *et al.*, 2004).

Hasil penelitian yang dikeluarkan oleh *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends* (SMART) pada tahun 2007 menunjukkan bahwa sebanyak 42,2% *Escherichia coli* dinyatakan positif ESBL. Hal ini diketahui dari kemampuannya baru-baru ini yang menghasilkan tipe baru atau derivat baru yang disebut dengan CTX-M yang merupakan penghasil ESBL dengan derivat baru yang mampu menghidrolisis antibiotik sefalosporin generasi ketiga yaitu Sefotaksim dan Seftazidim serta mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan β -lactam seperti Penisilin, dan Aztreonam. Bakteri penghasil ESBL dengan tipe atau derivat baru yaitu CTX-M digolongkan sebagai bakteri ESBL (Kang dan Song, 2013).

Hasil penelitian lain mengenai ESBL telah dilakukan di RS. Cipto Mangunkusumo pada tahun 2011 di Jakarta dengan hasil menunjukkan bahwa sebanyak 112 sampel isolat *Escherichia coli* yang dikumpulkan sebesar 58,42% diantaranya dinyatakan positif ESBL (Saharman dan Lestari, 2011). Penelitian lain juga dilakukan di RSUP. H. Adam Malik Medan pada bulan Juni 2011 - Juli 2012 dan hasil yang didapatkan sebanyak 91 sampel isolat *Escherichia coli* sebesar 53 diantaranya dinyatakan positif ESBL. Sehingga kasus ESBL merupakan tantangan baru bagi klinisi untuk mengatasi keresistensian yang diakibatkan oleh bakteri penghasil ESBL terhadap antibiotik golongan β -lactam (Mayasari, 2012).

Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati yang bisa dimanfaatkan sebagai antibakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Mulyono (2013) mengenai antibakteri alami yang dapat menghambat bakteri *E.coli* ESBL disebabkan adanya senyawa aktif seperti Flavonoid, Tannin, Alkaloid, Saponin dan Steroid (Mulyono, 2013). Alkaloid berperan sebagai antibakteri dengan cara menghambat dinding sel bakteri sehingga mengganggu komponen penyusun peptidoglikan dan mengakibatkan dinding sel sehingga berujung lisis (Chusnie dan Lamb, 2014). Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan cara mengganggu permeabilitas membran sel bakteri sehingga mengakibatkan lisis (Arabski *et al.*, 2012). Flavonoid memiliki kemampuan berinteraksi pada komponen-komponen sel bakteri yang dapat mempengaruhi kelangsungan hidup bakteri (Zabadi, 2011). Tannin memiliki mekanisme

kerja dengan menghambat permeabilitas membran sitoplasma pada bakteri dan mampu mengerutkan dinding sel (Retnowati *et al.*, 2011). Steroid bekerja dengan cara berinteraksi pada membran fosfolipid sel sehingga menyebabkan penurunan integritas sel (Rijayanti, 2014).

Senyawa pada daun cincau mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid di mana senyawa tersebut merupakan senyawa polifenol. Senyawa-senyawa tersebut berpotensi sebagai antibakteri (Sutandio, 2017). Sehingga pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak daun hijau (*Cyclea barbata* Miens) terhadap *Escherichia coli* Penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamase* (ESBL)

Metode

1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi tabung reaksi, pipet ukur, pipet volume, spatula, nampan, swab tisu, pinset, kertas cakram (oxid, UK), timbangan analitik, label, vortex mixer (Dlab MX-S, Indonesia), hotplate, ozon, oven, vacuum evaporator (Lanphan, Cina) dan alat-alat gelas. Alat untuk uji aktivitas antibakteri meliputi cawan petri, plastik wrap, bunsen burner, jarum ose, LAF (*Laminar Air Flow*), inkubator (memmert, Jerman), dan autoklaf (GEA/IS-B75L).

Bahan yang digunakan meliputi Simplisia daun Cincau (*Cyclea barbata* (L.) Miens.) diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan Jawa Timur, isolat bakteri *E. coli* ESBL diperoleh dari LAB Mikrobiologi Universitas Anwar Medika, media *Muller Hinton Agar* (MHA), *Nutrient Agar* (NA), Etanol 70%, H₂SO₄ 1%, BaCl₂ 1%, Aquadest

2. Pembuatan Ekstrak Daun Cincau Hijau

Metode yang digunakan untuk ekstraksi daun cincau menggunakan metode maserasi. Preparasi menggunakan simplisia serbuk daun cincau sebanyak 250g yang dimaserasi menggunakan pelarut etanol. Maserasi dilakukan selama 5 hari dan dipekatkan di dalam rotavapor suhu 40^o-50^oC.

3. Uji Aktivitas Antuibakteri

Uji antibakteri yang dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram yang berfungsi sebagai tempat zat antibakteri. Kertas cakram non antibiotik direndam dahulu di dalam ekstrak daun Cincau hijau yang telah dibuat dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100% kemudian diletakkan di dalam cawan petri yang sudah berisi biakan bakteri. Prosedur dilakukan di dalam LAF

dengan alat serta bahan yang sudah di sterilisasi terlebih dahulu. Kemudian di inkubasi di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C untuk melihat zona hambat yang dihasilkan.

a) Peremajaan bakteri *E.coli* ESBL

Diambil 1 ose isolat bakteri *E.coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Universitas Anwar Medika. Peremajaan bakteri uji menggunakan metode gores (*strike method*). Serangkaian prosedur kerja dilakukan didalam LAF. Isolat yang sudah diremajakan diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C (Winiati dan Nurwitri, 2012).

b) Pembuatan standar *Mc. farland*(0,5)

Diambil H₂SO₄ pekat sebanyak 0,1 mL dilarutkan dengan aquades 10 mL. Ditimbang BaCl₂ sebanyak 0,1 gram dilarutkan dengan aquades 10 mL. Masing-masing telah diperoleh larutan H₂SO₄ 1% dan larutan BaCl₂ 1%. Selanjutnya larutan H₂SO₄ 1% diambil sebanyak 9,95 mL dan larutan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan di-*vortex* sampai homogen (Sutton, 2011).

c) Pembuatan suspensi bakteri

Ditimbang NaCl sebanyak 0,09g kemudian dilarutkan dengan aquades 10 mL. Diambil 1-3 ose isolat bakteri *E.coli* dari media NA miring yang telah dibuat dicampur ke dalam larutan 10 mL NaCl fisiologis 0,9%. Dibandingkan kekeruhannya dengan larutan *Mc. Farland* yang telah dibuat dengan standar suspensi bakterial sebesar 1,5 x 10⁸ CFU/mL (Winiati dan Nurwitri, 2012).

d) Uji antibakteri *E. coli* ESBL

Pada uji antibakteri ini menggunakan metode difusi kertas cakram non antibiotik yang direndam di dalam ekstrak daun cincau yang telah dibuat dengan konsentrasi 50%, 75%, dan 100%. Dilakukan inokulasi bakteri dengan cara *cotton bud* steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri dan di swab secara zig-zag ke dalam cawan petri yang telah berisi MHA. Kertas cakram yang telah direndam diletakkan pada media MHA yang telah di inokulasi bakteri. Kemudian di inkubasi di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu konstan 37°C. Zona hambat yang dihasilkan kemudian dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{(D_V - D_C) + (D_H - D_C)}{2}$$

Keterangan:

D_V : Diameter Vertikal

D_H : Diameter Horizontal

D_C : Diameter Cakram

Analisis data menggunakan SPSS *Anova One Way* data dikatakan tidak homogen. Dilanjutkan menggunakan *Kruskal Wallis* data dikatakan tetap tidak homogen.

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun cincau tersaji pada tabel I dan gambar 1 di bawah ini.

Tabel I. Hasil Uji Aktivitas antibakteri ekstrak daun cincau terhadap *E.coli* ESBL

Pengulangan n	Zona Hambat Ekstrak Daun Cincau (mm)			
	Konsentrasi (%)			Kontro 1 (-)
	50%	75 %	100 %	
1	11,5	16,5	21	0
2	11,5	16,5	21	0
3	11	16	20,5	0
4	11	16	20,5	0
5	11,5	16	21	0
6	11	16,5	21	0
Rata-rata	11	16	21	0
+SD	0,25	0,25	0,22	0
Nilai P	(<P=0,05)			



Gambar 1. Hasil Uji Aktivitas antibakteri ekstrak daun Cincau terhadap *E. coli* ESBL pada media MHA

Simplisia serbuk daun cincau hijau diperoleh dari Materia Medika Batu Malang. Berdasarkan organoleptisnya, simplisia serbuk daun cincau berwarna hijau dan berbau aromatis seperti teh hijau.

Antibakteri adalah senyawa alami yang memiliki fungsi dan mekanisme kerja menghambat atau membunuh yang digunakan

pada sekelompok bakteri atau mikroba. Penelitian ini menggunakan ekstrak daun Cincau hijau sebagai bahan aktif yang bekerja sebagai zat antibakteri alami.

Berdasarkan penelitian oleh Atmawati *et al.*, (2014) menyatakan bahwa daun cincau hijau mengandung metabolit sekunder seperti Flavonoid, Alkaloid, Steroid, Saponin, Tannin, serta vitamin dan mineral. Senyawa tersebut berpotensi sebagai senyawa antibakteri (Sutandio, 2017). Senyawa aktif yang terkandung di dalamnya yang terdiri dari flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, dan steroid tersebut bersifat polar sehingga pada proses ekstraksi menggunakan metode maserasi atau ekstraksi secara dingin dan dibutuhkan pelarut yang bersifat polar. Salah satu jenis pelarut yang bersifat polar tersebut adalah etanol. Etanol sering digunakan sebagai cairan penyari atau pelarut didalam proses ekstraksi dikarenakan merupakan jenis pelarut yang mampu mengikat senyawa aktif dengan baik. Ekstrak daun cincau diperoleh dari metode yang dipakai yaitu maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama lima hari. Pemilihan prosedur ekstraksi dengan maserasi karena pada maserasi dilakukan tanpa pemanasan sehingga kandungan zat aktif pada simplisia tetap terjaga dari kerusakan akibat proses pemanasan. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh ekstrak pekat dengan proses pemanasan menggunakan oven dengan suhu 40-50°C selama empat hari. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh rendemen ekstrak daun cincau sebesar 25% dengan berat ekstrak yang diperoleh sebesar 62,4g berwarna hijau kehitaman dan berbau aromatis seperti teh hijau.

Pada uji antibakteri ini menggunakan metode *Kirby bauer*, diperoleh diameter 0,6 cm. Metode difusi adalah uji antibakteri yang didasarkan pada perpindahan zat aktif terhadap bakteri uji dengan menghasilkan suatu pengaruh yaitu terdapatnya *clear zone* (Zona bening yang terbentuk di sekeliling zat aktif saat setelah inkubasi) yang merupakan respon terhadap aktivitas hambat pertumbuhan pada bakteri (Winiati dan Nurwitri, 2012).

Penelitian ini menggunakan Media yaitu *Muller Hinton Agar* dan *Nutrient Agar* yang masing-masing memiliki fungsinya. MHA berfungsi sebagai media tempat pertumbuhan bakteri serta nutrisi pada bakteri dan zat aktif yang diujikan. NA berfungsi sebagai media peremajaan bakteri dan tempat penambahan nutrisi bakteri untuk menghasilkan isolate baru yang akan diujikan.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa ekstrak daun cincau hijau pada konsentrasi 50% diperoleh nilai rata-rata sebesar 11 mm yang tergolong kedalam klasifikasi lemah karena dibawah rentang nilai <10-15 mm. Pada konsentrasi 75% diperoleh nilai rata-rata sebesar 16 mm yang tergolong kedalam klasifikasi sedang karena diatas rentang nilai >15-20 mm. Pada konsentrasi 100% diperoleh nilai rata-rata sebesar 21 mm yang tergolong kedalam klasifikasi kuat karena diatas rentang nilai >20 mm.

Berdasarkan data penelitian uji antibakteri ekstrak daun cincau yang diuji menggunakan SPSS *Anova One Way* dengan nilai taraf signifikan (P) yang dipakai sebesar (P=0,05) diperoleh data terdapat perbedaan yang signifikan dengan nilai yang dihasilkan (P=0,000) dimana nilai lebih kecil dari (<P=0,05) yang artinya terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antar konsentrasi 50%, 75%, 100% dan kontrol (-) terhadap zona hambat yang dihasilkan. Data dapat dilihat pada tabel 4.7. Berdasarkan uji distribusi menggunakan *Kolmogorov Smirnov* diperoleh data berdistribusi normal dengan nilai yang dihasilkan (P=0,317) dimana nilai lebih besar dari (>P=0,05) yang artinya data menunjukkan sebaran yang luas dan berhubungan terhadap suatu kelompok atau variabel yang terikat. Dalam penelitian ini variabel yang terikat adalah zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi. Berdasarkan uji pengaruh menggunakan *Regresi Linier* diperoleh nilai koefisien determinasi (R) sebesar (R=0,999) yang artinya tingkat keberhasilan pada penelitian ini sebesar 0,999 atau sama dengan 99,9%. Dengan arti lain jika nilai (R) semakin mendekati angka satu (1) maka pengaruh yang dihasilkan akan semakin kuat. Dalam penelitian ini apabila semakin pekat suatu konsentrasi maka zona hambat yang dihasilkan semakin besar. Sedangkan sisanya (100% - 99,9% = 0,1%) yang dipengaruhi oleh variabel lain di luar persamaan regresi ini atau variabel yang tidak diteliti. Data uji *Regresi linier* dapat dilihat pada tabel 4.9. Selain dalam bentuk tabel, uji *Regresi linier* tersedia dalam bentuk grafik yang menunjukkan nilai rata-rata (X) terhadap konsentrasi (Y) terdapat pengaruh dengan hasil grafik yang semakin naik.

Simpulan dan Saran

Ekstrak daun cincau mampu menghambat bakteri *Escherichia coli* ESBL yang artinya terdapat aktivitas antibakteri dengan adanya zona hambat yang dihasilkan pada masing-masing konsentrasi 50%, 75%, 100% dan K(-). Berdasarkan uji perbedaan pada ekstrak daun cincau didapat nilai ($P=0,05$) yang terdapat perbedaan antar konsentrasi yang diperoleh dari masing-masing zona hambat yang dianalisis menggunakan *Anova One Way*. Berdasarkan uji pengaruh bahwa ekstrak daun cincau didapat nilai ($R=0,999$) yang terdapat pengaruh apabila semakin pekat suatu konsentrasi, maka zona hambat yang dihasilkan semakin kuat yang dianalisis menggunakan Regresi linier.

Daftar Pustaka

- Arabski, M., Węgierek-Ciuk, A., Czerwonka, G., Lankoff, A., & Kaca, W. (2012). Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Cushnie, T. T., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377-386.
- Nurrosyidah, I. H., & Mertaniasih, N. M. (2021). The effect of red passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) fermentation time on its activity against Extended Strain Methicillin-Resistant (ESBL) *Escherichia coli* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32(4), 723-727.
- Kang, C. I., & Song, J. H. (2013). Antimicrobial resistance in Asia: current epidemiology and clinical implications. *Infection & chemotherapy*, 45(1), 22-31.
- Kuntaman, K., Santoso, S., Wahjono, H., Mertaniasih, N. M., Lestari, E. S., Farida, H., ... & Purwono, P. B. (2012). The sensitivity pattern of extended spectrum beta lactamase-producing bacteria against six antibiotics that routinely used in clinical setting. *Journal of the Indonesian Medical Association*, 61(12).
- Mulyono, L. M. (2013). Aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji buah pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Calyptra*, 2(2), 1-9.
- Mulvey, M. R., Bryce, E., Boyd, D., Ofner-Agostini, M., Christianson, S., Simor, A. E., & Paton, S. (2004). Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(4), 1204-1214.
- Pajariu, A. (2010). *Infeksi Oleh Bakteri Penghasil Extended-Spectrum Beta-Lactamase (EsbI) Di Rsup Dr. Kariadi Semarang: Faktor Risiko Terkait Penggunaan Antibiotik* (Doctoral dissertation, Faculty of Medicine).
- Permanasari, D. A. (2016). *Aktivitas ekstrak etanol daun cincau hijau (Cyclea barbata Miers) sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri Salmonella typhi*. (Tesis, Universitas Jember)
- Retnowati, Y., Bialangi, N., & Posangi, N. W. (2011). Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada media yang diekspos dengan infus daun sambiloto (*Andrographis paniculata*). *Sainstek*, 6(2).
- Rijayanti, R. P. (2015). *Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun mangga bacang (Mangifera Foetida L.) terhadap Staphylococcus aureus secara in vitro* (Doctoral dissertation, Tanjungpura University).
- Saharman, Y. & Lestari, D.C. (2011). Phenotype Characterization of Beta - Lactamase Producing Enterobacteriaceae in the Intensive Care Unit (ICU) of Cipto Mangunkusumo Hospital. *The Indonesian Journal of Internal Medicine*. 45 (1). 11-16.
- Sirait, M. (2007). *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Sutandio, R. F. (2017). *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (Cyclea barbata Miers) Terhadap Staphylococcus aureus dan Vibrio parahaemolyticus* (Doctoral dissertation, UAJY).

- Sutton, S. (2011). Measurement of microbial cells by optical density. *Journal of Validation technology*, 17(1), 46-49.
- Toy, T. S., Lampus, B. S., & Hutagalung, B. S. (2015). Uji daya hambat ekstrak rumput Toy, T. S., Lampus, B. S., & Hutagalung, B. S. (2015). Uji daya hambat ekstrak rumput laut *Gracilaria* sp terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *e-GiGi*, 3(1).
- Winiati. & Nurwitri. (2012). *Mikrobiologi Pangan*. IPB Press. Bogor.
- Zabadi, F. (2011). *Daya Hambat Fraksi Semipolar Ekstrak Etanol Daun Benalu Mangga (Dendrophthoe petandra (L.) Miq.) Terhadap Pertumbuhan Escherichia coli Serta Brine Shrimp Lethality Test* (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Surakarta).