

**PENGARUH EKSTRAK METANOL FRAKSI ETIL ASETAT  
MADU TERHADAP PERTUMBUHAN *Escherichia coli*  
SECARA *in vitro***

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



**Oleh:**

**AGIL DANANJAYA**

**0910710029**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2013**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH EKSTRAK METANOL FRAKSI ETIL ASETAT MADU TERHADAP  
PERTUMBUHAN *Escherichia coli* SECARA *in vitro*

Oleh:

Agil Dananjaya

NIM: 0910710029

Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 4 Maret 2013

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Husnul Khotimah S.si,M.Kes

NIP. 19751125 200501 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III /Pembimbing II

DR. dra. Sri Winarsih, Apt. Msi

NIP. 19540823 198103 2 001

dr. Bambang Prijadi MS

NIP. 19520324 198403 1 002

Mengetahui,  
Kepala Jurusan Pendidikan Dokter FKUB,

Prof.Dr. dr.Teguh Wahyu Sardjono,DTM&H, M.Sc. Sp.Par.K.

NIP. 19520410 198002 1 001

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobil 'alamin atas berkat, rahmat, dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul: "Pengaruh Ekstrak Metanol Fraksi Etil Asetat Madu Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* Secara *In Vitro*".

Dukungan, masukan, kritik dan saran dari berbagai pihak telah menjadikan sesuatu yang tidak bernilai menjadi bernilai karena adanya proses pembelajaran yang terus berlangsung. Dengan selesainya Tugas Akhir ini, saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi saya kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof.Dr. dr.Teguh Wahyu Sardjono,DTM&H, M.Sc, Sp.Par.K ketua jurusan pendidikan dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi saya kesempatan dan membimbing dalam menuntut ilmu di jurusan pendidikan dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
3. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., MSi., sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan mulai dari proses awal pembuatan proposal, penelitian, hingga Tugas Akhir ini selesai.
4. dr. Bambang Prijadi, MS, sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan, sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
5. Husnul Khotimah S. si, M.Kes yang bersedia menjadi ketua tim penguji Tugas Akhir serta memberikan masukan untuk Tugas Akhir saya.

6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
7. Yang tercinta kedua orang tua saya, ibunda Suparyati dan ayahanda Parjoko, serta adik saya Pandu Wijayanto yang selalu mendukung dan mendoakan dalam penyelesaian Tugas Akhir ini.
8. Para personil laboratorium Mikrobiologi FKUB, Mbak Uci, Mas Hendri, Bu Yatik yang tidak hanya membantu dalam proses penelitian dan administrasi tetapi juga memberi semangat pada saya untuk segera menyelesaikan tugas akhir ini.
9. Sahabat - sahabatku, Ikram, Ferdian dan Tito yang juga merupakan teman seperjuangan di Mikrobiologi, yang sudah menjadi partner, memberi dukungan, membagi ilmunya selama proses pembuatan TA ini, serta selalu membantu dalam proses pengerjaan penelitian ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis berharap agar Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan dan menambah wawasan kepada pembaca sekalian. Akhir kata, tak ada gading yang tak retak, demikian pula dengan Tugas Akhir ini. Penulis membuka diri untuk semua saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan Tugas Akhir ini.

Malang, 5 Maret 2013

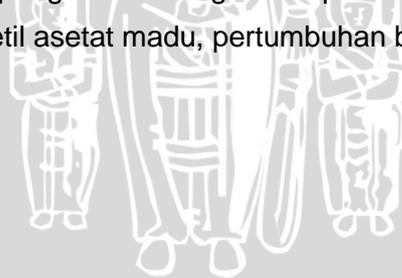
Penulis

## ABSTRAK

Dananjaya, Agil. 2013. **Pengaruh Ekstrak Metanol Fraksi Etil Asetat Madu Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* Secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt, MSi. (2) dr. Bambang Prijadi, MS.

*Escherichia coli* merupakan anggota *Enterobacteriaceae* dan bertanggung jawab pada 50 % infeksi diare bakterial akut. Pengobatan untuk mengobati diare bakterial akut ini adalah antibiotik. Antibiotik cukup efektif tetapi penggunaan antibiotik secara berlebihan dan tidak rasional dapat menyebabkan bakteri kebal terhadap antibiotik. Pada beberapa kasus ini tidak bisa ditangani dengan antibiotik, maka dibutuhkan suatu pendekatan alternatif termasuk menggunakan madu sebagai antimikroba. Madu memiliki potensi dalam menghambat laju pertumbuhan bakteri penyebab infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak metanol fraksi etil asetat madu terhadap pertumbuhan *E. coli*. Sampel diperoleh dari isolat klinis di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Madu diekstraksi menggunakan metode maserasi dan ekstraksi cair-cair. Konsentrasi ekstrak metanol fraksi etil asetat yang dipakai yaitu 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Penelitian ini adalah true experimental post test control only design dengan metode difusi cakram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi pertumbuhan *E. coli* di dalam zona difusi semua kelompok. Analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan (0,000) antar kelompok (one-way Anova,  $p < 0,05$ ). Uji korelasi dan regresi menunjukkan bahwa semakin meningkat konsentrasi ekstrak maka semakin luas zona difusi ( $R = 0,984$ ,  $p < 0,05$ ). Kesimpulan pada penelitian ini adalah ekstrak metanol fraksi etil asetat madu secara *in vitro* mempunyai pengaruh meningkatkan pertumbuhan *E. coli*.

**Kata kunci:** *E. coli*, fraksi etil asetat madu, pertumbuhan bakteri.

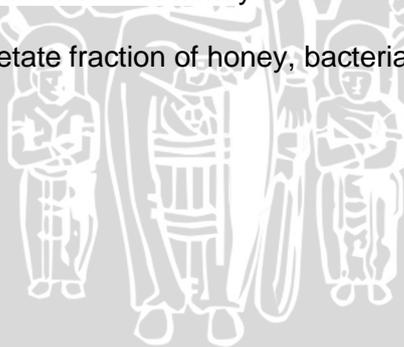


## ABSTRACT

Dananjaya, Agil. 2013. **Effect of Ethyl Acetate Fraction of Methanolic Extract of Honey Against *Escherichia coli* In Vitro**. Final Assigment, Medical Program, Faculty of Medicine Brawijaya University. Supervisors : (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt, MSi. (2) dr. Bambang Prijadi, MS.

*Escherichia coli* is a member of *Enterobacteriaceae* and responsible to 50 % in acute bacterial diarrhea infection. Treatment of acute diarrhea infection is antibiotics. Antibiotics can eradicate the sources of infection effectively, but utilizing of antibiotics redundantly and irrational can caused resistances of bacteria to antibiotics. In several cases, some antibiotics fail to treat this bacteria, thus is needed an alternative approach such as honey can be used. Honey has a potentiation to inhibit rates of bacterial growth. The purpose of this study was to determine the effect of the ethyl acetate fraction of methanolic extract of honey against growth of *E. coli*. Samples was obtained from clinical isolates in the Microbiology Laboratory of Faculty of Medicine Brawijaya University. Honey was extracted by maceration method and liquid extraction. The ethyl-acetate fraction of methanolic extract of honey concentrations used were 12,5%, 25%, 50%, and 100%. This study was a true experimental post test control-only design with disk difussion method. The result showed that *E coli* grows in diffusion zone all groups. Statistical analysis showed significant difference effect (0.000) among groups (one-way Anova,  $p < 0,05$ ). Regression correlation test showed that the higher extract concentration, the larger of diffusion zone ( $R = 0.984$ ,  $p < 0,05$ ). The conclusion of this study is the ethyl-acetate fraction of methanolic extract of honey in vitro has effect on increasing of *E. coli* growth.

Keywords : *E. coli*, ethyl acetate fraction of honey, bacterial growth



DAFTAR ISI

Judul .....	i
Halaman Lembar Pengesahan .....	ii
Halaman Kata Pengantar.....	iii
Abstrak (Bahasa Indonesia).....	v
Abstract ( Bahasa Inggris).....	vi
Daftar Isi .....	vii
Daftar Gambar .....	ix
Daftar .....	x
Tabel.....	
Daftar Lampiran.....	xi
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.3.1 Tujuan Umum .....	3
1.3.2 Tujuan Khusus .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
1.4.1 Manfaat Akademis .....	3
1.4.2 Manfaat Aplikatif .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	5
2.1.1 Taksonomi <i>E. coli</i> .....	5
2.1.2 Morfologi <i>E. coli</i> dan Identifikasi.....	6



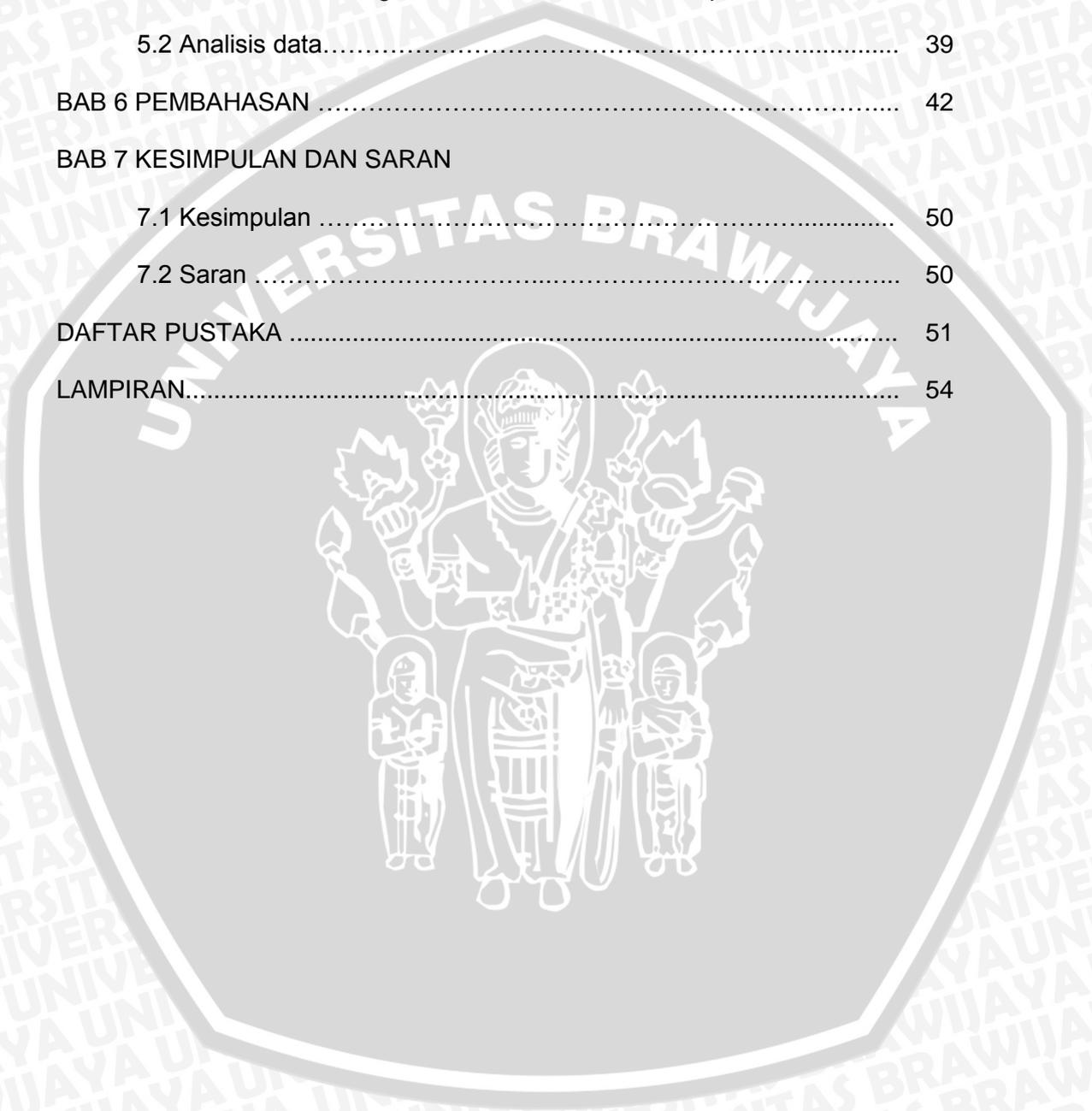
2.1.3 Patogenitas <i>E. coli</i> .....	6
2.1.4 Diagnosis Laboratorium.....	12
2.1.5 Pengobatan.....	12
2.2 Madu.....	13
2.2.1 Pengertian Madu.....	13
2.2.2 Penggolongan Madu.....	13
2.2.3 Komposisi Madu.....	14
2.2.4 Sifat Antibakteri Madu.....	14
2.3 Antimikroba.....	16
2.4 Uji Sensitivitas Bakteri terhadap Antimikroba.....	17
2.4.1 Metode Dilusi.....	17
2.4.1.1 Dilusi Tabung.....	17
2.4.1.2 Dilusi Agar.....	18
2.4.2 Metode Difusi Cakram.....	19
2.5 Metode Ekstraksi Bahan Alam.....	20
2.5.1. Definisi.....	20
2.5.2. Metode Umum Ekstraksi Bahan Alam.....	20
2.5.3. Langkah-langkah Ekstraksi.....	21
2.5.4. Parameter Memilih Metode Ekstraksi.....	22
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	24
3.2 Hipotesis Penelitian .....	25
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Desain Penelitian .....	26
4.2 Estimasi Jumlah Sampel.....	26

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian .....	26
4.3 Variabel Penelitian .....	27
4.3.1 Variabel Tergantung Penelitian .....	27
4.3.2 Variabel Bebas Penelitian.....	27
4.5 Definisi Operasional .....	27
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	28
4.6.1 Pembuatan Ekstrak metanol fraksi etil asetat madu.....	28
4.6.1.1 Alat.....	28
4.6.1.2 Bahan.....	28
4.6.2 Identifikasi Bakteri.....	28
4.6.2.1 Alat.....	28
4.6.2.2 Bahan.....	28
4.6.3 Uji Kepekaan Antimikroba.....	29
4.6.1.1 Alat.....	29
4.6.1.2 Bahan.....	29
4.7 Metode Pengumpulan Data.....	29
4.7.1 Pembuatan Ekstrak metanol fraksi etil asetat madu.....	29
4.7.2 Uji Identifikasi Bakteri.....	30
4.7.2.1 Pemurnian Bakteri .....	30
4.7.2.2 Uji Konfirmasi Bakteri.....	30
4.7.3 Uji Kepekaan Antimikroba.....	31
4.8 Pengolahan Data.....	32

## BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian .....	33
5.1.1 Hasil identifikasi bakteri .....	33

5.1.2 Hasil Ekstrak Metanol Fraksi Etil Asetat Madu.....	34
5.1.3 Hasil Uji Antimikroba.....	34
5.1.3.1 Hasil Pengamatan Pertumbuhan E.coli pada medium ....	34
5.2 Analisis data.....	39
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	42
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
7.1 Kesimpulan .....	50
7.2 Saran .....	50
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	51
<b>LAMPIRAN</b> .....	54



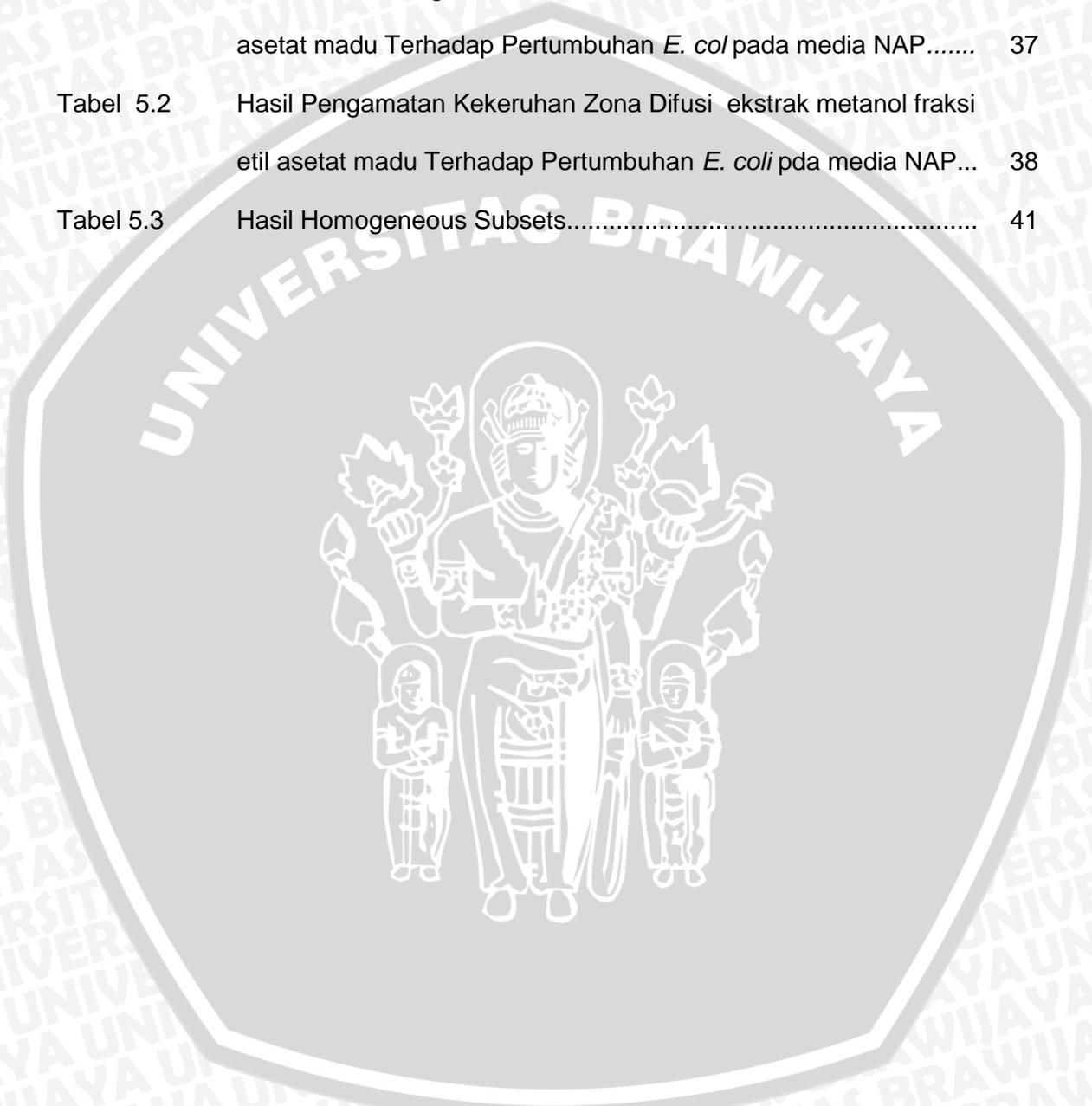
DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	24
Gambar 5.1	<i>E. coli</i> dengan pewarnaan Gram perbesaran 1000 x.....	33
Gambar 5.2	Pertumbuhan <i>E.coli</i> dalam Media <i>Eosin Methylin Blue</i> .....	33
Gambar 5.3	Hasil Ekstrak metanol fraksi etil asetat madu.....	34
Gambar 5.4	Hasil Pengamatan pada Pengulangan 1, 2, 3, 4, 5 dan Kontrol.....	35
Gambar 5.5	Pemeriksaan Mikroskopik <i>E.coli</i> Perbesaran 1000 x.....	36
Gambar 5.6	Pertumbuhan <i>E.coli</i> dalam media <i>Eosin Methylin Blue</i> .....	37
Gambar 5.7	Rerata Zona Difusi Tiap Konsentrasi.....	38



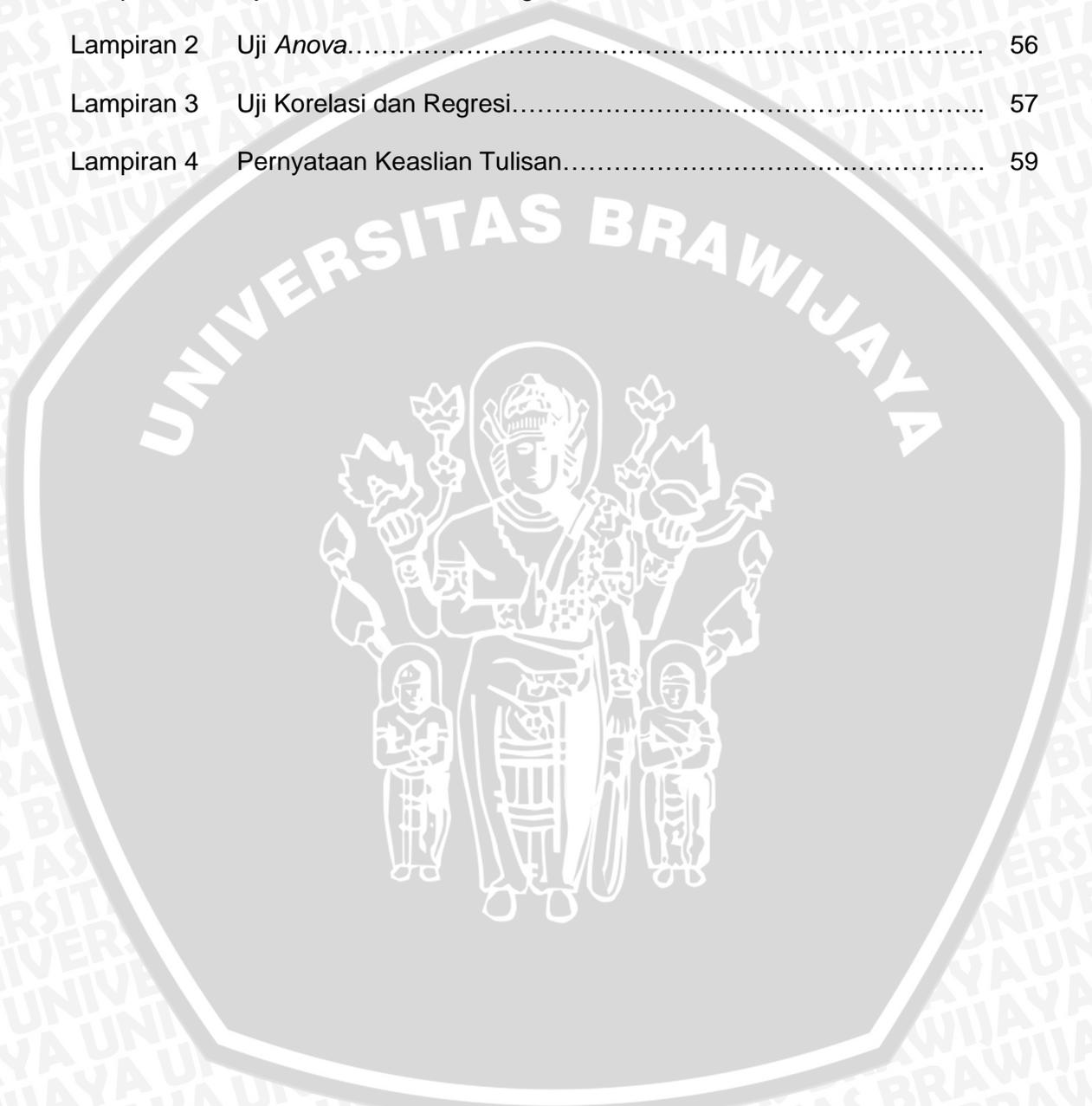
DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Hasil Rerata Pengukuran Zona Difusi Ekstrak metanol fraksi etil asetat madu Terhadap Pertumbuhan <i>E. coli</i> pada media NAP.....	37
Tabel 5.2	Hasil Pengamatan Kekeruhan Zona Difusi ekstrak metanol fraksi etil asetat madu Terhadap Pertumbuhan <i>E. coli</i> pada media NAP...	38
Tabel 5.3	Hasil Homogeneous Subsets.....	41



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Uji Normalitas dan Homogenitas.....	54
Lampiran 2	Uji Anova.....	56
Lampiran 3	Uji Korelasi dan Regresi.....	57
Lampiran 4	Pernyataan Keaslian Tulisan.....	59



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi adalah penyakit yang secara klinis menimbulkan tanda-tanda dan gejala-gejala medis penyakit yang terjadi akibat infeksi, keberadaan dan pertumbuhan agen biologik patogenik pada organism host individu. Patogen penginfeksi meliputi bakteri, virus, jamur, protozoa, parasit multiseluler, dan prion. Patogen-patogen ini merupakan penyebab epidemi penyakit. Di Indonesia, penyakit infeksi masih sering terjadi dengan tingkat mortalitas dan morbiditas yang tinggi. Menurut data Depkes RI (2007) sepuluh penyakit terbanyak pada masyarakat Indonesia yaitu penyakit infeksi.

Salah satu bentuk nyata penyakit infeksi adalah diare akut bakterial. Pada dasarnya diare akut bakterial terjadi akibat adanya bakteri enteropatogen atau flora normal yang mengalami migrasi. Diare jenis ini dapat disebabkan salah satunya oleh *Eschericia coli* (*E. coli*). *E. coli* merupakan anggota *Enterobacteriaceae* dan bertanggung jawab pada 50 % infeksi diare bakterial akut. Pengobatan untuk mengobati diare bakterial akut ini adalah menggunakan antibiotik.

Antibiotik sebagai agen pembunuh bakteri penyebab infeksi cukup efektif untuk eradikasi patogen akibat infeksi. Namun, penggunaan antibiotik secara berlebihan dan tidak rasional dapat menyebabkan berkembangnya bakteri yang kebal terhadap antibiotik. Pada beberapa kasus yang tidak bisa ditangani dengan antibiotik, maka dibutuhkan suatu pendekatan alternatif termasuk menggunakan madu sebagai antimikroba

Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati, dan berpotensi besar dalam pengembangan obat-obatan herbal. Salah satu aplikasi produk alami yang dapat dimanfaatkan adalah madu. Madu merupakan produk organik yang dihasilkan oleh lebah madu. Madu memiliki potensi dalam menghambat kelajuan dari pertumbuhan bakteri penyebab infeksi. Kandungan bahan-bahan aktif pada madu yang memiliki daya antimikroba, yaitu flavonoid, yang diduga mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Bahan aktif tersebut dapat merusak integritas dinding sel sehingga dapat menghambat atau membunuh bakteri (PDPERSI, 2005).

Beberapa penelitian yang berhubungan dengan madu telah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan Mohapatra, *et., al.* (2012) bahwa ekstrak metanol fraksi etil asetat madu menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap pertumbuhan *E. coli* secara signifikan dengan luas zona hambat sebesar 26.49 mm dibandingkan dengan kontrol positif ciprofloxacin 16.67 mm dan tetracyclin 16.03 mm. Penelitian tersebut mengambil kesimpulan bahwa madu mempunyai aktivitas antimikroba (efek bakterostatik dan bakteriosidal) sehingga dapat digunakan sebagai pengganti antibiotik terhadap bakteri tertentu. Pada penelitian yang dilakukan Cooper, *et., al.* (2002) menunjukkan bahwa madu mempunyai sensitifitas terhadap bakteri Gram positif, bakteri yang sensitif atau resisten terhadap antibiotik.

Di sisi lain, pada penelitian Rahman, *et al.* (2010) madu gagal untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* pada konsentrasi 375 mg mL<sup>-1</sup>. *E. coli* lebih resisten daripada *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi yang sama. Haynes and Callaghan (2011) menyebutkan bahwa madu dilaporkan pernah gagal mengeliminasi infeksi dan gagal membunuh bakteri yang diambil dari luka kronis.

Berdasarkan hal yang telah diuraikan di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak madu terutama dari fraksi etil asetat terhadap pertumbuhan *E. coli*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak metanol fraksi etil asetat madu memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan *E. coli* secara *in vitro*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh ekstrak metanol fraksi etil asetat madu terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* dalam studi *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak metanol fraksi etil asetat madu dengan pertumbuhan *E. coli*.

1.3.2.2 Mengetahui kadar hambat minimal ekstrak metanol fraksi etil asetat terhadap pertumbuhan *E. coli*

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat digunakan sebagai dasar penelitian selanjutnya dan mendukung perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kedokteran, terutama yang berhubungan dengan antimikroba herbal.

#### 1.4.2 Manfaat Aplikatif

1.4.2.1 Memperkaya pengetahuan tentang khasiat madu sebagai obat

1.4.2.2 Mengembangkan obat antimikroba alternatif alami, murah, dan mudah sebagai pengobatan infeksi *E. coli*.



## Bab 2

## TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)2.1.1. Taksonomi *E. coli*

Dalam taksonomi bakteri *E.coli* diklasifikasikan sebagai berikut :

Domain	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: $\gamma$ -Proteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Species	: <i>Escherichia coli</i> (Prescott, 2002)

Pada genus *Escherichia*, terdapat satu spesies bakteri yang sering diisolasi, yaitu *E. coli*. *E.coli* bertanggung jawab pada hampir semua infeksi klinis sementara spesies yang lain hanya menyebabkan infeksi klinis kurang dari 1 % (Dzen, et al., 2003).

*Escherichia adecarboxylata* adalah isolat manusia yang sangat jarang, diklasifikasikan sebagai *enteric group* 41. *Escherichia hermannii* dahulu diklasifikasikan sebagai *enteric group* 11, bisa didapatkan sebagai isolat darah dan cairan spinal. *Escherichia vulneris* dahulu diklasifikasikan sebagai *enteric group* 21, dapat diisolasi dari infeksi luka. *Escherichia fergusonii* dahulu diklasifikasikan sebagai *enteric group* 10, dapat diisolasi dari darah dan air seni. *Escherichia blattae* tidak terisolasi dari sumber manusia tetapi dari usus kecoa (Dzen, et al., 2003).

### 2.1.2. Morfologi *E. coli* dan Identifikasi

*Escherichia coli* merupakan bakteri batang Gram negatif yang tidak membentuk spora. *E. coli* mempunyai diameter 0,5  $\mu\text{m}$  dan panjang 1,0-3,0  $\mu\text{m}$ . *E. coli* secara umum bersifat motil dalam cairan dan berfimbria. Pili tipe 1 adalah bagian yang paling umum dan diekspresikan, baik pada fase *switch on* atau *off*, yang berujung pada status berpili atau nonpili (de Sousa, 2006).

*E. coli* merupakan bakteri anaerob fakultatif yang dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit dan ketika difermentasikan di medium yang mengandung glukosa atau jenis karbohidrat yang lainnya, akan memproduksi asam dan gas terutama  $\text{H}_2$  dan  $\text{CO}_2$ . Dengan pemeriksaan biokimia, *E. coli* akan memberikan hasil positif pada produksi indole dan tes *methyl red* (VM) (de Sousa, 2006), lisin dekarboksilase dan fermentasi manitol (Dzen, *et al.*, 2003). Sebagian besar galur, akan memberikan hasil negatif pada reaksi oksidase, citrate, urease dan hydrogen sulfide (de Sousa, 2006). Dari isolat dengan cepat teridentifikasi *E. coli* karena kemampuannya memberikan hemolisis tipe  $\beta$  pada agar darah, morfologi koloni seperti kilatan logam (*metallic sheen*) pada media EMB dan tes *spot indole* positif (Dzen, *et al.*, 2003).

Sebagian besar galur *E. coli* dapat tumbuh pada temperature dengan rentang yang lebar (15-48 derajat C), laju pertumbuhan maksimal pada rentang (37-42 derajat C). *E. coli* dapat tumbuh pada rentang pH 5,5-8,0 dengan pertumbuhan paling baik pada pH netral (de Sousa, 2006).

### 2.1.3. Patogenitas *E. coli*

*E. coli* adalah flora normal usus dan menjadi patogen jika jumlah bakteri ini meningkat atau berada diluar usus (Sri, 2010). *E. coli* mempunyai tiga struktur

antigen, yaitu tipe antigen O, tipe antigen H, dan tipe antigen K. terdapat lebih dari 164 antigen O, 100 antigen K, dan 50 antigen H untuk *E. coli*. Antigen H selanjutnya dibagi menjadi subgroup L, A, dan B. Penentuan profil antigen dari berbagai galur *E. coli* berguna untuk penelitian epidemiologi dan penelitian yang berhubungan dengan jenis penyakit diare (Dzen, *et al.*, 2003).

*E. coli* memproduksi faktor virulensi mulai faktor struktural sampai toksin yang diekskresikan, yaitu:

a. Faktor permukaan

*E. coli* yang disolasi dari penderita memproduksi kapsul asam polisialat yang dikatakan sebagai antigen K<sub>1</sub>. Kapsul K<sub>1</sub> memiliki keunikan karena kapsul ini tahan terhadap pembunuhan baik oleh neutrofil maupun serum normal manusia. Kapsul K<sub>1</sub> membantu kelangsungan hidup bakteri ini dalam darah dan cairan spinal karena kemiripannya dengan bentuk embrionik asam polisialat dari neural cell adhesion molecules (NCAM) (Dzen, *et al.*, 2003)

*E. coli* memiliki tipe antigen O yang mengekspresikan fimbriae tipe S yang memiliki predileksi ikatan pada reseptor yang terdapat pada endothelium vaskuler dan lapisan epitel plexus choroidali dan ventriculus otak anak kucing. Selain fimbriae tipe S, *E. coli* juga memproduksi fimbriae tipe lain, yaitu *mannose sensitive fimbriae* dan *mannose resistant fimbriae*. Fimbria yang sensitive dengan mannose disebut fimbria tipe I atau disebut juga sebagai common pili karena ditemukan hampir semua *E. coli*. Patogenisitas fimbria tipe I belum jelas karena tidak ada korelasi antara ada tidaknya fimbria dengan penyakit. Fimbria yang resistant mannose lebih kompleks. Termasuk dalam grup ini adalah adhesin. Tanpa memandang sifat dasarnya, tampaknya menunjukkan adanya hubungan antara adhesin dengan faktor-faktor virulensi yang lain. Tipe lain dari grup ini

adalah fimbria tipe P. Disebut tipe P karena kemampuannya untuk melekat pada *human P blood group antigen*. Antigen ini mengandung gugus Gal ( $\alpha$ 1-4) dan Gal  $\beta$ , yang juga terdapat pada manusia pada sel darah, ginjal dan kandung kemih. Grup lain dari adhesin adalah faktor X, meskipun belum mempunyai mekanisme yang jelas tampaknya faktor X ini melekat pada tempat selain *human P blood group antigen* dan bagian yang mengandung manosa. *Mannose resistant fimbria* dan faktor adhesin-adhesin tersebut merupakan faktor perlekatan penting pada infeksi intestinal yang disebabkan oleh *E. coli* (Dzen, *et al.*, 2003). Terdapat lebih dari 150 antigen O, K dan H. huruf-huruf tersebut digunakan sebagai formula antigen, yaitu menggabungkan huruf-huruf tersebut dengan jumlah antigen yang ada, contoh : O111:K76:H7) (Ryan *and* Ray, 2004).

#### b. Enterotoksin

Beberapa galur *E. coli* memproduksi enterotoksin. Kemampuan untuk memproduksi toksin ini terutama tergantung oleh adanya plasmid yang menyandi toksin. Galur *E. coli* yang memiliki plasmid tertentu akan memproduksi enterotoksin yang tidak tahan panas (LT) yang mirip dengan enterotoksin dari penyebab kolera (CT). CT ataupun LT tersusun dari sub unit A dan B. subunit B akan berikatan pada gangliosid GM sedangkan subunit A akan dihidrolisan dan fragmen A<sub>1</sub> akan memasuki sel hospes. Fragmen A<sub>1</sub> akan mengkatalisis proses adenosine-disulfat (ADP) dari nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD) ke subunit regulator dari adenil siklase yang kemudian akan meningkatkan kadar cAMP. Peningkatan kadar cAMP akan menyebabkan pelepasan elektrolit dan cairan dari dalam sel. Potensi LT lebih rendah 100 kali dari CT. Kelas kedua dari LT adalah LT-II yang tidak mempunyai hubungan reaktifitas imunologis dan homologi nukleotida dengan LT (Dzen, *et al.*, 2003).

*E. coli* juga memproduksi toksin yang tahan panas (ST), yaitu ST-I dan ST-II. ST-I berikatan kuat dengan reseptor intestinal spesifik dan kemudian mengaktifkan guanilatsiklase dalam sel mukosa intestinal, menyebabkan respon sekresi terutama melalui absorpsi Na dan Cl oleh membran *brush border*. Meskipun mekanisme kerja ST-II belum jelas, tetapi tidak melibatkan produksi siklik nukleotida (Dzen, *et al.*, 2003).

c. Verotoksin (*sigalike toxins*)

*E. coli* yang diinfeksi oleh bakteriofag akan memproduksi sitotoksin yang disebut verotoksin. Ada dua jenis verotoksin, yaitu: VT-1 dan VT-2. VTEC berhubungan dengan tiga sindroma, yaitu diare, kolitis hemoragik dan sindrom ureum hemolitik. Timbulnya sindroma tersebut tergantung dari kadar toksin. VTEC level tinggi memproduksi sejumlah besar toksin dan berhubungan dengan tiga sindroma tersebut, sedangkan VTEC level rendah tampaknya tidak berhubungan dengan timbulnya penyakit (Dzen, *et al.*, 2003).

d. Faktor-faktor lain

Galur *E. coli* hemolitik dapat bersifat enteroinvasif. Hemolitik terjadi akibat adanya hemolisin yang tidak hanya melisis eritrosit, namun juga sitotoksik pada leukosit dan fibroblast. Kemampuan lisis dari hemolisin tampaknya karena penyisipan molekul hemolisin ke dalam membrane lipid, menyebabkan pengaktifan kanal selektif kation yang mengakibatkan peningkatan permeabilitas membrane terhadap kalsium, potasium, manosa, dan sukrosa. Peranan hemolisin kemungkinan berhubungan dengan usaha untuk mendapatkan besi dari lingkungan di mana kemungkinan dari besi terikat erat dengan molekul dengan protein atau berada dalam konsentrasi yang sangat rendah. Cara lain untuk

mendapatkan besi adalah dengan produksi *iron-celating sideropore aerobactin* (Dzen, *et al.*, 2003).

Manifestasi klinik infeksi oleh *E. coli* bergantung pada tempat infeksi dan tidak dapat dibedakan dengan gejala-gejalanya infeksi yang disebabkan oleh bakteri lain (Jawetz, *et al.*, 1995; Dzen, *et al.*, 2003 ; Ryan and Ray, 2004; Sri, 2010). Penyakit yang disebabkan oleh *E. coli*, yaitu :

a. Infeksi saluran kemih

*E. coli* merupakan penyebab infeksi saluran kemih pada kira-kira 90 % wanita muda. Gejala dan tandanya antara lain poliuria, disuria, hematuria dan pruria serta nyeri panggul. ISK dapat menyebabkan bakteremia dengan tanda klinik sepsis. Terjadinya gangguan ginjal berhubungan dengan *E. coli* nefropatogenik yang memproduksi hemolisin, dan antigen K tampaknya berhubungan dengan pathogenesis ISK bagian atas.

b. Diare

*E. coli* yang dapat menyebabkan diare banyak ditemukan di seluruh dunia. *E. coli* diklasifikasikan oleh cirri khas, sifat-sifat virulensinya, dan setiap kelompok menimbulkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda. Ada lima kelompok galur *E. coli* patogen, yaitu :

1) *E. coli* Enteropatogenik (EPEC)

EPEC adalah penyebab diare pada bayi, khususnya di negara berkembang. EPEC sebelumnya dikaitkan dengan wabah diare pada anak-anak di negara maju. EPEC melekat pada sel mukosa intestine, menyebabkan penggundulan mikrovili. Infeksi EPEC menyebabkan diare cair *watery diarrhea* yang biasanya sembuh sendiri tetapi kadang-kadang menimbulkan infeksi kronis.

Durasi diare oleh UPEC bisa diperpendek dan diare kronis dapat disembuhkan dengan pemberian antibiotik.

### 2) *E. coli* Enterotoksigenik (ETEC)

ETEC merupakan penyebab utama diare pada pelancong dan juga merupakan penyebab diare sangat penting pada bayi di negara-negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik pada manusia menyebabkan adhesi pada sel-sel epitel usus kecil. Beberapa galur ETEC memproduksi eksotoksin tidak tahan panas (LT) yang bersifat antigenik, mengadakan reaksi silang dengan *V. cholerae* dan dapat merangsang terbentuknya antibody netralisasi dalam serum dan juga di permukaan epitel usus. Selain LT, beberapa galur juga memproduksi ST dibawah kontrol genetik plasmid. Jika ETEC memproduksi kedua toksin ini menimbulkan gejala diare yang lebih berat.

### 3) *E. coli* Enteroinvasif (EIEC)

EIEC menyebabkan penyakit yang mirip dengan shigelosis. Penyakit yang paling sering pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju negara tersebut. Galur EIEC tidak mengadakan fermentasi laktosa atau mengadakan fermentasi secara lambat dan bergerak. EIEC menimbulkan penyakit dengancara mengadakan invasi ke dalam sel epitel mukosa intestinal.

### 4) *E. coli* Enterohemoragik (EHEC)

EHEC dan beberapa galur memproduksi verotoksin (VTEC). VTEC menyebabkan serangkaian kejadian luar biasa diare, kolitis hemoragik dan HUS. Kolitis hemotagik bersifat akut dan sembuh spontan, ditandai dengan nyeri abdomen, diare cair disertai darah. HUS ditandai dengan kegagalan ginjal akut, anemia hemolitik mikroangiopati, dan trombositopenia. Sumber infeksi bisa berasal dari daging dan produk hewan seperti susu.

#### 5) *E. coli* Enteroagregatif (EAEC)

EAEC menyebabkan diare akut dan kronis pada masyarakat di negara berkembang, ditandai dengan pola perlekatan yang khas pada sel-sel manusia. Masih sangat sedikit yang diketahui tentang faktor-faktor virulensi galur EAEC.

#### c. Sepsis

Bila pertahanan inang normal tidak mencukupi. *E. coli* dapat memasuki aliran darah dan menyebabkan sepsis. Sepsis bisa terjadi sebagai efek sekunder dari infeksi saluran kemih.

#### d. Meningitis

*E. coli* adalah salah satu penyebab utama meningitis pada bayi. *E. coli* dari kasus meningitis memiliki antigen K<sub>1</sub>. Mekanisme virulensi yang berhubungan dengan antigen K<sub>1</sub> masih belum jelas.

### 2.1.4. Diagnosis Laboratorium

*E. coli* tumbuh dengan baik pada media-media yang lazim digunakan untuk *Enterobacteriaceae* dan kebanyakan galur mudah diidentifikasi dengan metode yang umum digunakan di laboratorium. Namun demikian, isolat *E. coli* yang berasal dari bahan pemeriksaan terkontaminasi, tidak selalu berarti bahwa bakteri tersebut penyebab infeksi (Dzen, *et al.*, 2003).

### 2.1.5. Pengobatan

Kebanyakan organism yang berhasil diisolasi dari penderita di masyarakat biasanya sensitif terhadap kebanyakan antibiotika. Bentuk resisten bisa juga terjadi, terutama pada penderita-penderita yang sebelumnya telah diberi antibiotik. Pengobatan yang paling baik untuk diare adalah manajemen

keseimbangan cairan dan elektrolit tanpa mengenyampinkan penggunaan agen kausatif, yaitu antibiotik. Antibiotika yang bisa digunakan, antara lain sulfonamide, ampisilin, sefalosporin, kloramfenikol, tetrasiklin dan aminoglikosida. Jenis antibiotik yang paling sering digunakan adalah ampisillin (Dzen, *et al.*, 2003; Ryan and Ray, 2004).

Pemberian profilaksis dengan trimetroprim-sulfametoksazol (ko-trimoksazol) dapat mengurangi insiden diare pelancong. Penggunaan obat tersebut adalah jangka pendek (< 2 minggu). Namun, beberapa klinisi menyakini bahwa profilaksis hanya akan menimbulkan organisme yang resisten dan potensial untuk terjadinya karier (Dzen, *et al.*, 2003 ; Ryan and Ray, 2004).

## **2.2. Madu**

### **2.2.1. Pengertian Madu**

Madu adalah cairan kental yang dihasilkan oleh lebah madu dari berbagai sumber nektar. Senyawa-senyawa yang terkandung dalam madu berasal dari nektar berbagai jenis bunga. Nektar adalah suatu senyawa kompleks yang dihasilkan oleh suatu kelenjar nectrifier tanaman dalam bentuk larutan gula yang bervariasi. Komponen utama nektar adalah sukrosa, fruktosa dan glukosa serta terdapat juga dalam jumlah sedikit zat-zat gula lainnya (Adji, 2004; Sri, 2009 ).

### **2.2.2. Penggolongan Madu**

Madu berdasarkan nektarnya dapat digolongkan menjadi tiga, yaitu :

- a. Madu Ekstrafloa adalah madu yang dihasilkan dari nektar diluar bunga, seperti daun, cabang atau batang tanaman.

- b. Madu Flora adalah madu yang dihasilkan dari nektar bunga. Madu yang berasal dari satu jenis bunga disebut madu monoflora., sedangkan madu yang berasal dari beberapa jenis bunga disebut madu poliflora.
- c. Madu embun adalah madu yang dihasilkan dari cairan hasil sukresi serangga yang melekatkan gulanya pada tanaman, kemudian dikumpulkan oleh lebah madu dan disimpan di sarang madu.

### **2.2.3. Komposisi Madu**

Madu mengandung banyak mineral mineral seperti natrium, kalsium, magnesium, besi, fosfor, dan kalium. Vitamin-vitamin yang terdapat dalam madu adalah thiamin (B1), ribovlavin (B2), asam askorbat (C), piridoksin (B6), niasin, asam pantotenat, biotin, asam folat, dan vitamin K. sedangkan enzim yang penting dalam madu adalah enzim diastase, invertase, glukosa oksidase, peroksidase dan lipase. Selain itu unsure kandungan lain madu adalah memiliki zat antibakteri (Adji, 2004; Sri, 2009).

Kandungan gula pada madu mencapai 80 %, asam utama yang terdapat dalam madu adalah asam glutamate. Sementara itu, asam organik yang terdapat dalam madu adalah asam asetat, asam butirat, format, suksinat, glikolat, malat, proglutamat, sitrat dan piruvat (Adji, 2004; Sri, 2009).

### **2.2.4. Sifat Antibakteri Madu**

Berdasarkan hasil penelitian paling tidak terdapat empat faktor yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri pada madu. Pertama, kadar gula yang tinggi akan menghambat bakteri sehingga bakteri tersebut tidak dapat hidup dan berkembang. Kedua, tingkat keasaman madu yang tinggi (pH 3, 65) akan mengurangi pertumbuhan dan daya hidup bakteri, sehingga bakteri tersebut

akan mati. Ketiga, senyawa radikal hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) yang bersifat dapat membunuh mikroorganisme patogen. Keempat, adanya senyawa organik yang bersifat antibakteri seperti *polifenol*, *flavonoid*, dan *glikosida* (Kamaruddin, 2002; Sri, 2009).

Senyawa antibakteri yang telah teridentifikasi dari madu adalah inhibin. Beberapa mikroba ternyata sangat peka terhadap inhibin, bakteri Gram negatif lebih peka daripada Gram positif. Kadar inhibin dalam madu sangat bergantung pada jenis, umur, dan kondisi madu. Inhibin sangat sensitive terhadap suhu  $60^\circ C$ , keaktifan inhibin dalam madu hilang dalam waktu 15 menit (Winarno, 1981; Sri, 2009).

### 2.3. Antimikroba

Sumber senyawa antimikroba pada umumnya merupakan hasil sintesis dan memiliki toksisitas selektif yaitu membunuh bakteri-bakteri patogen tanpa menimbulkan efek pada flora normal hospes. Suatu antimikroba dapat bersifat bakterisida dimana antimikroba tersebut membunuh bakteri dengan parameter kadar bunuh minimum (KBM). Istilah "*bakterisidal*" digunakan untuk obat yang menyebabkan kematian organisme (Socket and Valley, 2006).

Suatu antimikroba disebut bakteristatik jika dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan parameter kadar hambat minimum (KHM). Kadar hambat Minimal (KHM) adalah dilusi tertinggi (konsentrasi terendah) dari suatu antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Nilai KHM dilaporkan berdasar garis pedoman interpretasi: sensitif (S), Intermediaet (I), Resisten (R) yang telah dibuat oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Terkadang, *no interpretation* (NI) dilaporkan pada hasil KHM. ini berarti tidak ada

garis pedoman untuk menginterpretasi terhadap kepekaan suatu bakteri atau antimikroba yang sedang diuji (Sockett *and* Valley, 2006).

Istilah “bakteriostatik” menggambarkan suatu obat yang sewaktu-waktu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Keberhasilan pengobatan ini sering bergantung pada partisipasi mekanisme pertahanan tubuh inang. Lebih jauh, efeknya dapat berubah apabila obat dihilangkan, organisme akan tumbuh kembali, dan infeksi atau penyakit akan kambuh. Kadang-kadang pengobatan jangka panjang dengan obat-obat bakteriostatik dapat membunuh populasi tertentu, sedangkan dengan obat bakterisidal mungkin gagal, baik *in vitro* maupun *in vivo* (Katzung, 2007).

Berdasar spektrum kerjanya, antimikroba dibagi menjadi antimikroba dengan spektrum sempit dan antimikroba dengan spektrum luas. Antimikroba berspektrum sempit contohnya adalah golongan penisillin (benzil penisillin, penisillin V, nafsillin, metisilin, kloksasillin, oksasilin), dan streptomisin. Antimikroba dengan spektrum luas contohnya tetrasiklin, golongan sulfa (sulfonamid, krotimoksazol, para amino-salisilat (PAS), sulfon (dapson), golongan penisillin (aminopenisillin, tikarsillin, karbenisillin) dan kloramfenikol (Sockett *and* Valley, 2006).

Dalam upaya membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri, antibiotik bekerja dengan beberapa aksi diantaranya:

a. Menghambat sintesis dinding sel bakteri

Dinding sel bakteri yang merupakan prokariotik terdiri dari peptidoglikan sehingga antibiotik ini relative aman untuk sel hospes karena dinding sel eukariot tidak memiliki peptidoglikan. Rusaknya dinding sel bakteri menyebabkan lisis (Dzen *et al*, 2003).

b. Merusak membran sel

Fungsi dari membrane sel adalah untuk menjaga komposisi internal dari sel dan menjaga permeabilitas selektif dan proses transport aktif. Rusaknya membrane sel dapat menyebabkan metabolit penting dalam sel keluar sel dengan akibat kematian sel (Dzen *et al*, 2003).

c. Menghambat sintesis protein

Penghambatan sintesis protein dapat dilakukan dengan penghambatan perpanjangan rantai polipeptida, mencegah perjalanan ribosom sepanjang mRNA, atau dengan mengubah struktur ribosom dan bentuk kodon pun ikut berubah. Hal ini mengakibatkan *misreading* oleh anti kodon pada tRNA (Dzen *et al*, 2003).

d. Menghambat sintesis asam nukleat

Penghambatan sintesis asam nukleat ini dapat dilakukan dengan menghambat sintesis mRNA pada proses transkripsi, atau menghambat replikasi DNA pada proses pembelahan sel. Bisa juga dengan mengikat enzim *DNA-dependent RNA Polimerase* atau mengganggu enzim *DNA-gyrase* yang berperan pada proses replikasi DNA sehingga tidak terbentuk asam nukleat (Dzen *et al*, 2003).

## 2.4. Uji Sensitivitas Bakteri Terhadap Antimikroba

### 2.4.1 Metode Dilusi

#### 2.4.1.1 Dilusi Tabung

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari obat anti mikroba. Prinsipnya dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu

sel mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Ada satu tabung yang hanya diisi bahan aktif tanpa bakteri sebagai kontrol negatif dan ada pula satu tabung yang hanya diisi oleh bakteri biakan sebagai kontrol positif. Selanjutnya, seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM obat. KHM ini adalah kemampuan dari agen antimikroba yang menghambat multiplikasi bakteri uji (sebagai bakteristatik). Untuk mengukur kemampuan antimikroba untuk membunuh mikroorganisme, perlu dilakukan tes aktivitas bakterisidal dengan menggunakan modifikasi dari tes dilusi tabung. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya (22-24 jam) diamati ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan < 0,1% inokulum original disebut kadar bunuh minimal (KBM) dari bahan antimikroba (Baron, *et al*, 1994; Dzen, *et al*, 2003).

#### 2.4.1.2 Dilusi Agar

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dari bahan antimikroba. Prinsipnya adalah dengan menggunakan medium agar padat *Mueller-Hinton*, yang diperkaya dengan 5% *defibrinated sheep blood*. Pada saat dilakukan uji antimikroba bahan yang diujikan diencerkan terlebih dahulu, kemudian diinokulasikan pada medium agar. Setelah itu diinkubasikan dalam

suhu 37°C selama 48 jam. KHM dicatat sebagai konsentrasi terendah dari bahan antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Ge, *et.al.*, 2002).

#### 2.4.2 Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram dilakukan dengan menjenuhkan obat ke dalam kertas saring (cakram kertas). Cakram kertas yang mengandung obat tertentu ditanam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang diuji, kemudian diinkubasikan 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya zona jernih di sekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba. Apabila ada zona inhibisi yang cukup luas (sesuai dengan skala yang dipakai), maka menunjukkan bahwa antimikroba bekerja efektif, tetapi apabila tidak ada zona inhibisi menunjukkan bahwa bakteri resisten terhadap antimikroba tersebut (Baron, *et a.l.*, 1994; Dzen *et al*, 2003).

Untuk mengetahui hasil uji kepekaan terhadap antimikroba dapat dilakukan dua cara sebagai berikut:

- a. Kirby Bauer, yaitu dengan membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) di sekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Dengan table NCCLS ini dapat diketahui criteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten.
- b. Joan Stokes, yaitu dengan membandingkan radius zona hambatan antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Pada cara Joan Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen *et al*, 2003).

Interpretasi hasil dari metode difusi cakram ini tergantung dari perlakuan ketika tes. Variabel yang mempengaruhi antara lain dalamnya, pH, kandungan kation, suplemen, dan sumber dari agar *Mueller Hinton*; umur dan turbiditas inokulum bakteri; cara inokulum menyebar di cawan; suhu, udara, dan durasi inkubasi; metode pembacaan hasil; antimikroba yang berada pada cawan, umur dan kondisi penyimpanannya (Baron, *et al.*, 1994).

## 2.5 Metode Ekstraksi Bahan Alam

### 2.5.1 Definisi

Ekstraksi merupakan metode untuk memisahkan bahan aktif alam dari komponen inaktif menggunakan pelarut pilihan menggunakan standar prosedur ekstraksi. Standarisasi prosedur ekstrak berperan signifikan terhadap kualitas bahan alam yang diambil (ICS-UNIDO, 2008).

### 2.5.2 Metode Umum Ekstraksi Bahan Alam

Menurut ICS-UNIDO (2008), ekstraksi senyawa aktif dari bahan alam dapat dilakukan dengan metode maserasi, infusi, digesti, dekoksi, perkolasi, dan soxhlet.

- **Maserasi**

Dalam proses ini, bahan alam dibuat bubuk dan direndam bersama pelarut selama minimal 3 hari pada suhu ruangan dalam wadah tertutup. Wadah ini secara berkala diagitasi.

- **Infusi**

Prinsip hampir sama dengan maserasi tetapi waktu perendaman lebih singkat dengan air dingin atau mendidih.

- **Digesti**

Prinsip hampir sama dengan maserasi tetapi menggunakan pemanas dalam proses ekstraksi.

- **Dekoksi**

Dalam proses ini, bahan alam direbus dengan volume air yang spesifik selama waktu yang ditentukan. Kemudian didinginkan, disaring. Prosedur ini sangat cocok untuk mengekstrak bahan yang larut air, komposisi stabil terhadap panas.

- **Perkolasi**

Prosedur ini paling banyak digunakan untuk mengekstrak bahan aktif alam terutama ekstrak cairan. Perkolasi menggunakan alat berupa perkolator.

- **Soxhlet**

Dalam prosedur ini, bahan yang akan diekstrak ditaruh pada alat soxhlet. Keuntungan dari metode soxhlet ini adalah banyak bahan aktif alam yang dapat diekstrak dengan jumlah pelarut yang sedikit. Prosedur ini lebih cocok untuk mengekstrak bahan dalam skala menengah dan besar.

### 2.5.3 Langkah-Langkah Ekstraksi

Langkah-langkah yang dilakukan untuk mengekstrak bahan aktif alam adalah pengurangan ukuran, proses ekstraksi, dan filtrasi (ICS-UNIDO, 2008)

- a. Pengurangan ukuran

Tujuan pengurangan ukuran bahan yaitu untuk memotong organ, jaringan dan struktur sel sehingga bahan aktif yang terkandungnya terpapar bahan pelarut. Selain itu, pengurangan ukuran berfungsi untuk memaksimalkan

area permukaan yang bermanfaat untuk memperkuat prinsip transfer masa aktif dari bahan alam ke pelarut.

b. Ekstraksi

Ekstraksi bahan alam dapat dilakukan dengan 3 cara, yaitu :

- Perkolasi air dingin
- Ekstraksi air panas (*Decoction*)
- Ekstraksi pelarut (Dingin atau Panas)

c. Filtrasi

Hasil ekstraksi yang sudah jadi kemudian dipisahkan dari ampas dengan menggunakan penyaring.

#### 2.5.4 Parameter Memilih Metode Ekstraksi

- d. Menggunakan bagain tumbuhan yang benar, untuk tujuan kontrol kualitas, mencatat waktu dan tempat pengambilan bahan alam.
- e. Terkait bahan aktif alam:
- Jika bahan aktif yang akan digunakan adalah non polar, maka pelarut yang dipakai adalah bahan non-polar.
  - Jika bahan aktif yang akan digunakan adalah termolabil, metode yang digunakan adalah maserasi dingin atau perkolasi. Untuk termostabil, metode yang digunakan soxhlet dan dekoksi.
  - Untuk ekstraksi panas, suhu yang lebih tinggi daripada yang diperlukan sebaiknya dihindari.
  - Standarisasi waktu ekstraksi :
    - Waktu yang tidak cukup berarti ekstraksi tidak sempurna.

- Jika waktu ekstraksi lebih panjang, maka bahan aktif yang tidak diperlukan juga ikut terekstrak.

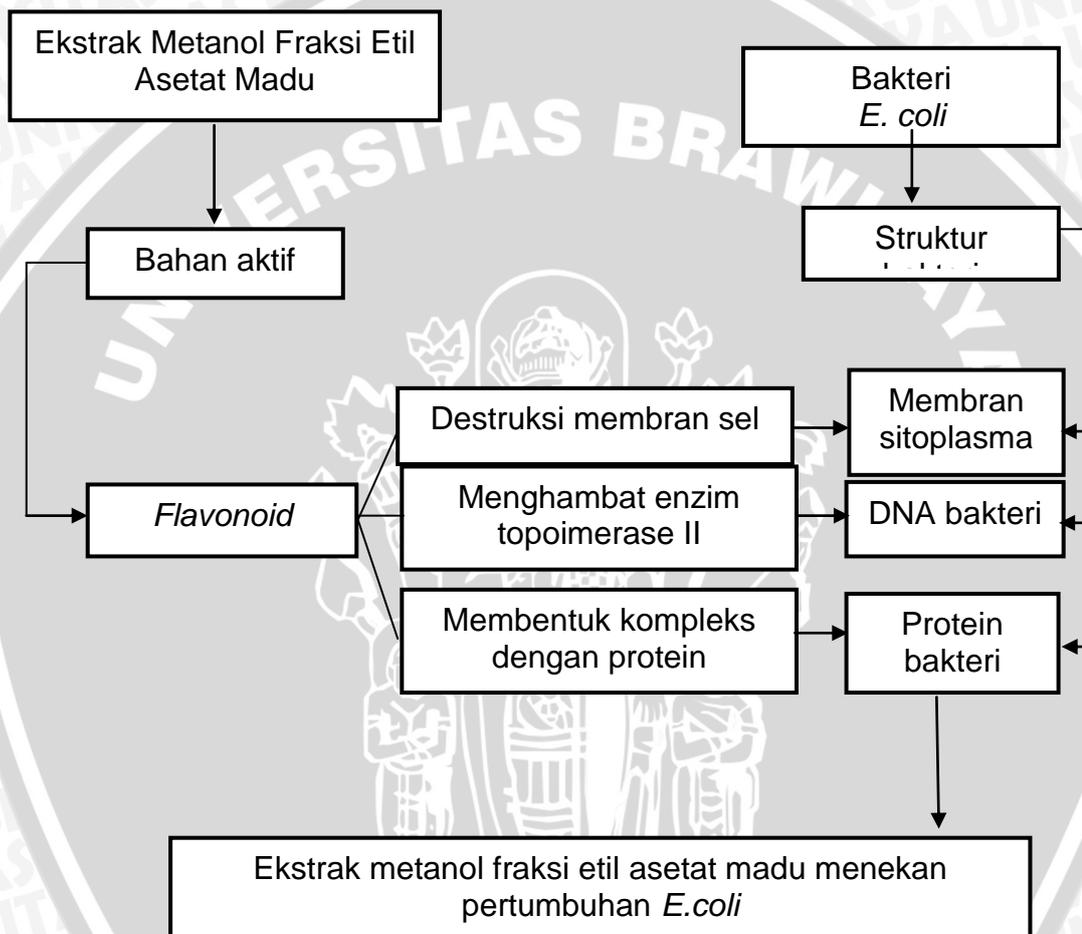
(ICS-UNIDO, 2008).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Ekstrak metanol fraksi etil asetat madu mempunyai zat yang bersifat sebagai antimikroba yaitu *flavonoid*. *Flavonoid* bekerja sebagai inhibitor *topoisomerase tipe II* yang akan menghambat replikasi dan transkripsi DNA bakteri dan dapat berikatan dengan protein bakteri yaitu protein ekstraseluler dan terlarut serta dinding sel bakteri. Disamping itu, flavonoid juga merusak integritas



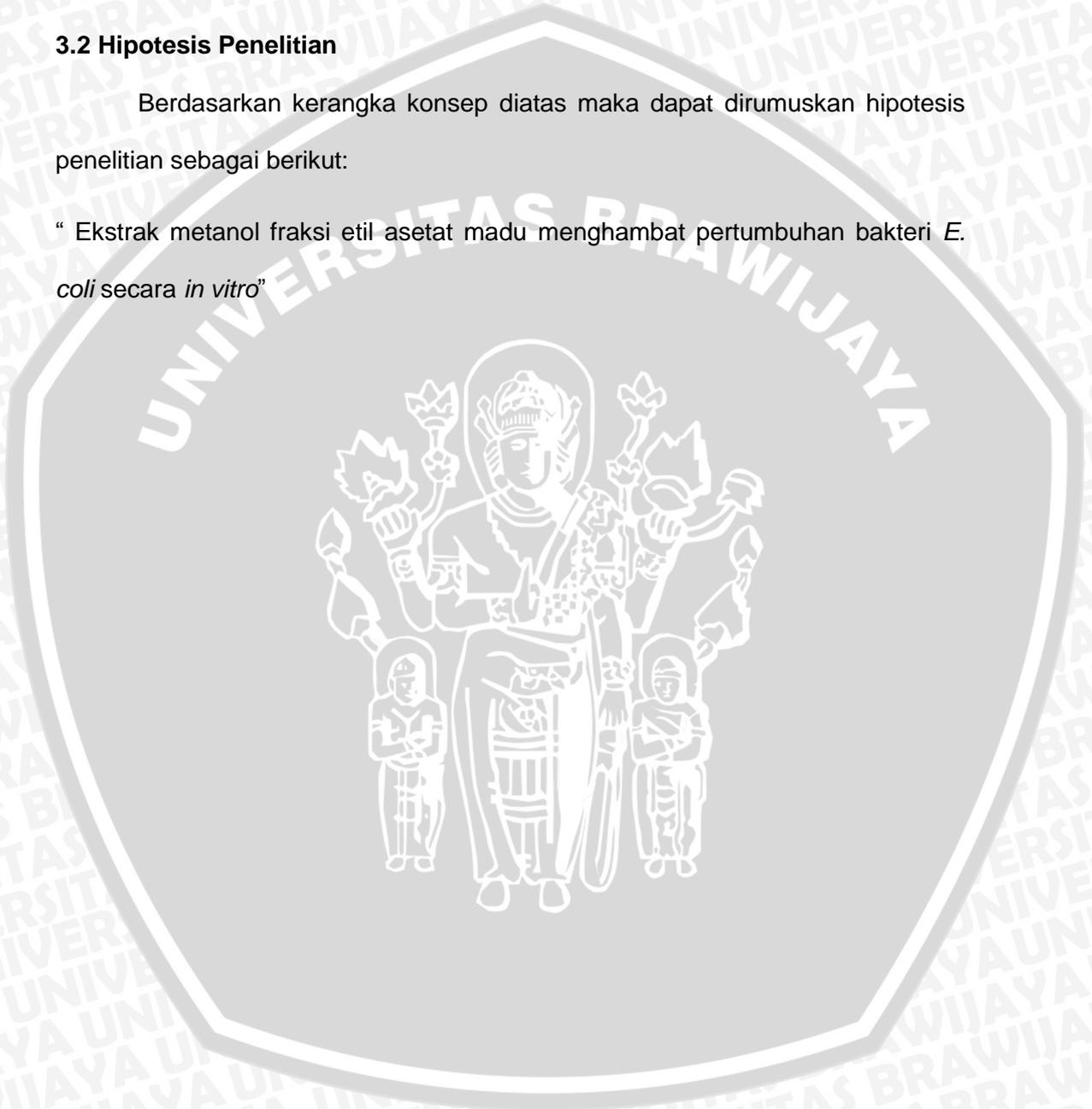
dinding sel bakteri melalui ikatannya dengan protein ekstraseluler dan dinding sel.

Semua efek-efek tersebut pada akhirnya mengakibatkan kematian *E. Coli*.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep diatas maka dapat dirumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut:

“ Ekstrak metanol fraksi etil asetat madu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* secara *in vitro*”



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian akan dilakukan adalah penelitian dengan teknik eksperimental dengan desain *post test only* menggunakan ekstrak metanol madu terhadap pertumbuhan *E. coli* secara *in vitro* melalui metode difusi cakram untuk mengetahui ekstrak metanol fraksi etil asetat madu tergolong sensitif, intermediet atau resisten terhadap pertumbuhan *E. coli*.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Sampel yang digunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri *E. coli* yang dimiliki oleh laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Besar sampel yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$p(n-1) \geq 15 \text{ (Solimun, 2001)}$$

$$4(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$n \geq 4,75$$

$$n = 5$$

Keterangan : p = Jumlah perlakuan

n = Jumlah sampel

sehingga jumlah sampel minimal adalah 5

#### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Prosedur pembuatan ekstrak metanol madu fraksi etil asetat dilaksanakan di laboratorium kimia Politeknik Negeri Malang. Identifikasi,

pembiakan *E. coli* dan uji antimikroba dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Februari 2013.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel (Bebas) Independen

Ekstrak metanol fraksi etil asetat madu dibuat dalam 4 konsentrasi yang berbeda, yaitu : 12,5 %, 25 %, 50 %, dan 100 %.

##### 4.4.2 Variabel (Terikat) Dependen

Diameter zona inhibisi yang tampak di sekitar kertas cakram.

#### 4.5 Definisi Operasional

- a. Madu yang digunakan adalah jenis madu hutan multifloral. Madu diperoleh dari Al Wadey dan bersertifikat untuk menyatakan keaslian madu. Kadar air yang terkandung dalam madu sebesar 18 %. Madu diekstrak dengan pelarut metanol dengan metode maserasi
- b. Bakteri yang digunakan adalah isolat *E. coli* yang diperoleh dari spesimen yang berasal dari feses 5 orang yang penderita dikoleksi di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- c. Zona inhibisi adalah zona bening yang terbentuk di sekitar cakram dan menunjukkan bahwa bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin lebar zona inhibisi, semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak metanol fraksi etil asetat madu.
- d. Diameter zona inhibisi diukur dalam satuan millimeter (mm).

## 4.6 Alat dan Bahan Instrumen Penelitian

### 4.6.1 Pembuatan Ekstrak Metanol Fraksi Etil Asetat Madu

#### 4.6.1.1 Alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak metanol fraksi etil asetat madu, yaitu : seperangkat alat gelas, neraca analitik, labu ukur 100 mL, pipet ukur 1 mL dan 2 mL, corong pisah 1000 mL, *stopwatch*, penguap putar vakum.

#### 4.6.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak metanol fraksi etil asetat madu, yaitu : pelarut metanol, pelarut n-heksan, pelarut etil asetat, sampel madu.

### 4.6.2 Uji Identifikasi Bakteri

#### 4.6.2.1 Alat

Alat yang digunakan, yaitu: cawan petri, ose, tabung reaksi, labu erlenmeyer, inkubator, gelas obyek, bunsen, korek api, spidol permanen, pipet steril 10 ml, mikroskop, penggaris, dan *colony counter*.

#### 4.6.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan, yaitu: *nutrient broth*, NAP, aquades, pewarnaan Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), minyak emersi, *eosin methylin blue (EMB) agar*.

### 4.6.3 Uji Kepekaan Antimikroba

#### 4.6.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam uji kepekaan antimikroba antara lain: tabung reaksi dengan larutan salin steril, standar kekeruhan 0.5 McFarland, ose, kapas swab, inkubator, lampu spiritus, *blank disk*, dan vortex.

#### 4.6.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam uji kepekaan antara lain: ekstrak metanol fraksi etil asetat madu, *E. coli* pada plate agar *Mueller Hinton*/NAP.

### 4.7 Metode Pengumpulan Data

#### 4.7.1 Pembuatan Ekstrak Metanol Fraksi Etil Asetat Madu

Sampel madu ditimbang sebanyak 50 gram (40 mL) dimaserasi dengan metanol 250 mL hingga sampel madu terendam selama 24 jam. Setelah 24 jam, akan terbentuk dua bagian. Bagian atas berupa lapisan berwarna coklat bening dan bagian bawah berupa endapan sisa madu. Bagian atas ini dipisahkan menggunakan penguap vakum putar hingga sample madu mengental dan diperoleh ekstrak kental metanol berwarna coklat kemerahan. Kemudian ditambahkan 100 mL metanol-air (7:3) dan diuapkan. Ekstrak kental metanol-air tersebut dipartisi dalam dua tahap, yaitu dengan n-heksan dan etil asetat. Partisi tahap pertama, yaitu dengan n-heksan sebanyak 100 mL sehingga diperoleh 2 lapisan yaitu bagian atas adalah n-heksan dan lapisan bawah adalah metanol-air. Ekstrak kental metanol-air dipartisi dengan menggunakan etil asetat sebanyak 100 mL sehingga diperoleh dua lapisan yaitu bagian atas etil asetat dan bagian bawah adalah metanol-air. Kemudian dilakukan pemekatan dengan menggunakan pemutar vakum sehingga diperoleh ekstrak kental etil asetat

berwarna kuning, ekstrak metanol-air berupa ekstrak kental berwarna coklat dan lengket yang mengandung komponen – komponen kimia yang tidak larut dalam n-heksan dan etil asetat (Ida, *et al.*, 2012).

#### 4.7.2 Uji Identifikasi Bakteri

##### 4.7.2.1 Pemurnian Bakteri

Dilakukan pemurnian bakteri terlebih dahulu dengan menanam bakteri yang diduga *E. coli* pada NAP, diinkubasikan dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

##### 4.7.2.2 Uji Konfirmasi Bakteri

Dilakukan uji konfirmasi, masing-masing dilakukan dengan pewarnaan Gram, pembenihan pada EMB (*Eosin Methylin Blue*)

Masing-masing uji konfirmasi adalah sebagai berikut:

###### a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui jenis bakteri tersebut bersifat Gram (+) atau Gram (-), serta untuk mengetahui morfologi bakteri. Langkah-langkah pewarnaan Gram (Baron, *et al.*, 1994 dan Dzen, *et al.*, 2003): membuat sediaan bakteri *E. coli* dalam *object glass*, dikeringkan di udara dan kemudian difiksasi. Meneteskan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Membuang sisa bahan warna dan dibilas dengan air yang mengalir. Meneteskan larutan lugol (iodine), ditunggu selama 1 menit kemudian membuang sisa bahan warna dan dibilas dengan air yang mengalir. Meneteskan alkohol 96% dan ditunggu selama 5-10 detik, kemudian bilas dengan air yang mengalir. Meneteskan safranin dan ditunggu selama 30 detik selanjutnya buang sisa bahan warna dan dibilas dengan air yang

mengalir. *Object glass* dikeringkan dengan kertas penghisap dan dilihat di bawah mikroskop pembesaran 1000 x.

b. Pembenihan EMB

Biakan *E. coli* (1 ose) ditaman pada agar EMB dan diinkubasikan semalam pada suhu 37 derajat celcius.

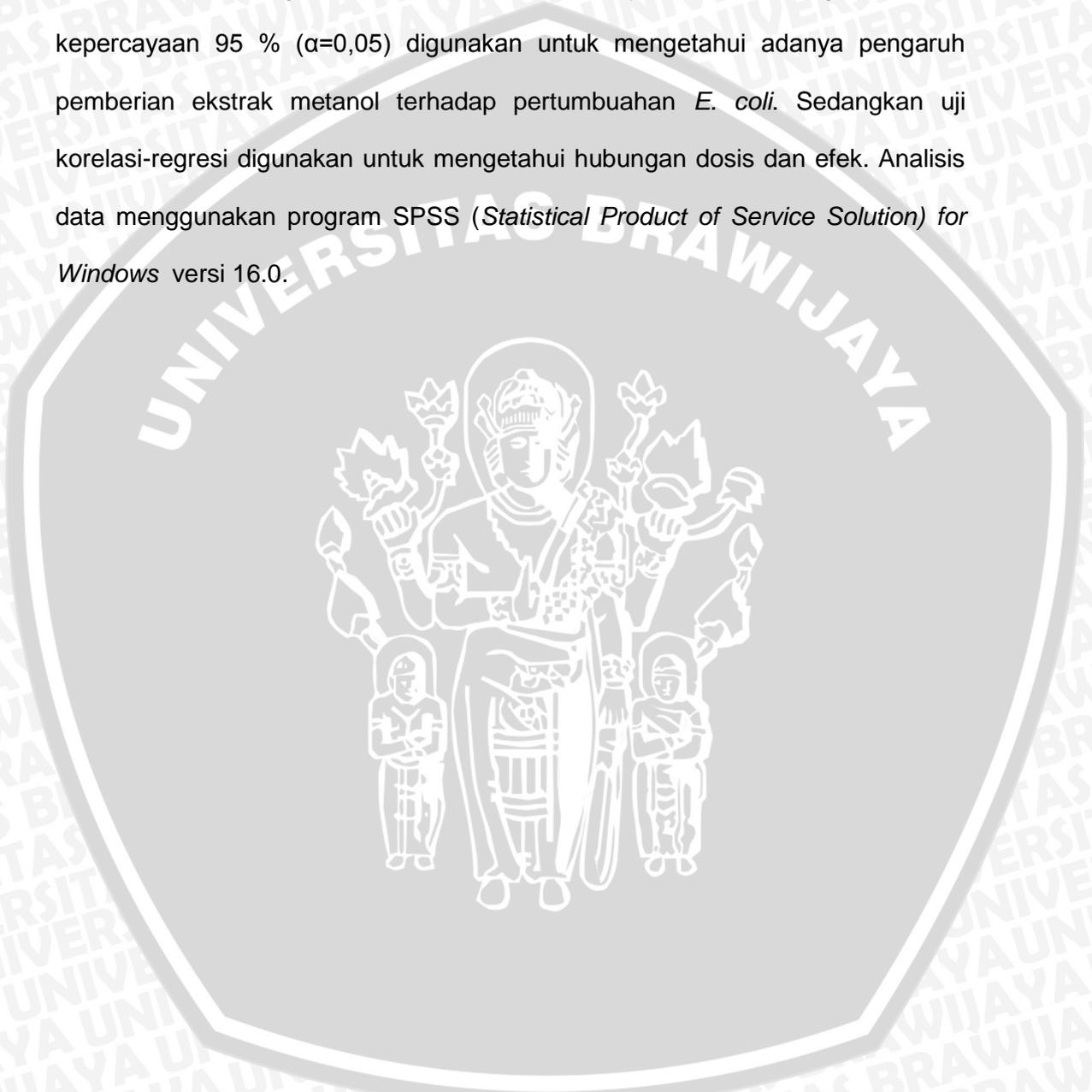
#### 4.7.3 Uji Kepekaan Antimikroba

Uji kepekaan ekstrak metanol madu menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi cakram mengacu pada metode Joan Stokes (Prescott, 2002). Ose disentuhkan pada koloni bakteri yang tumbuh di media agar kemudian diinokulasikan di tabung reaksi yang sudah berisi larutan salin steril selanjutnya diinkubasikan selama beberapa jam pada suhu 35° C sampai sedikit keruh dan dicocokkan dengan standar kekeruhan McFarland. Kapas swab steril dimasukan dalam larutan suspensi bakteri kemudian diusapkan di permukaan plate agar Mueller-Hinton. Hasil usapan suspensi bakteri ditunggu sampai kering, sekitar 5 menit.

Membuat konsentrasi ekstrak metanol madu 12,5 %, 25 %, 50 %, dan 100 %. *Blank disk* direndam dalam masing-masing konsentrasi sekitar 5 menit. Gentamysin dan *Blank disk* yang sudah berisi konsentrasi ditunggu sampai kering dan ditempatkan di permukaan agar Mueller-Hinton yang sudah kering, kemudian diinkubasikan selama 16 sampai 18 jam pada inkubator dengan suhu 37° C. Diameter zona inhibisi diukur dengan menggunakan penggaris atau kaliper dengan satuan mm.

#### 4.8 Pengolahan Data

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way* ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95 % ( $\alpha=0,05$ ) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak metanol terhadap pertumbuhan *E. coli*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui hubungan dosis dan efek. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0.



## BAB 5

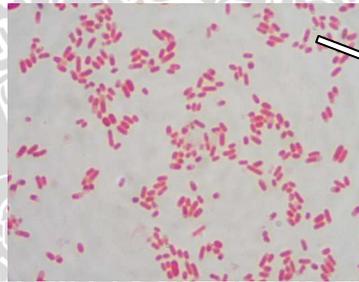
### HASIL DAN ANALISA

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

Identifikasi dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan cara pengecatan Gram, dan penanaman pada *EMB*.

Dengan pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop obyektif perbesaran 1000X tampak sel bakteri berbentuk batang dan berwarna merah, hal tersebut menunjukkan bahwa bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif.



Batang Gram negatif  
(berwarna merah)

**Gambar 5.1** *E. coli* dengan Pewarnaan Gram perbesaran 1000 x

Penanaman pada media *EMB* dan didapatkan gambaran hijau mengkilat (*metallic sheen*). Hasil tersebut merupakan karakteristik dari bakteri ini.



*E. coli* berwarna  
*metallic sheen*

**Gambar 5.2** Pertumbuhan *E. coli* Dalam Media *Eosin Methylin Blue*

### 5.1.2 Hasil Ekstrak Metanol Fraksi Etil Asetat Madu

Hasil akhir dari ekstrak metanol fraksi asetat madu adalah fraksi kental n-heksan berwarna kuning sedikit lengket sebanyak 3 mL, fraksi kental etil asetat berwarna kuning kecoklatan sebanyak 6 mL. dan fraksi kental metanol-air berangsur menjadi berwarna coklat dan lengket sebanyak 30 mL.



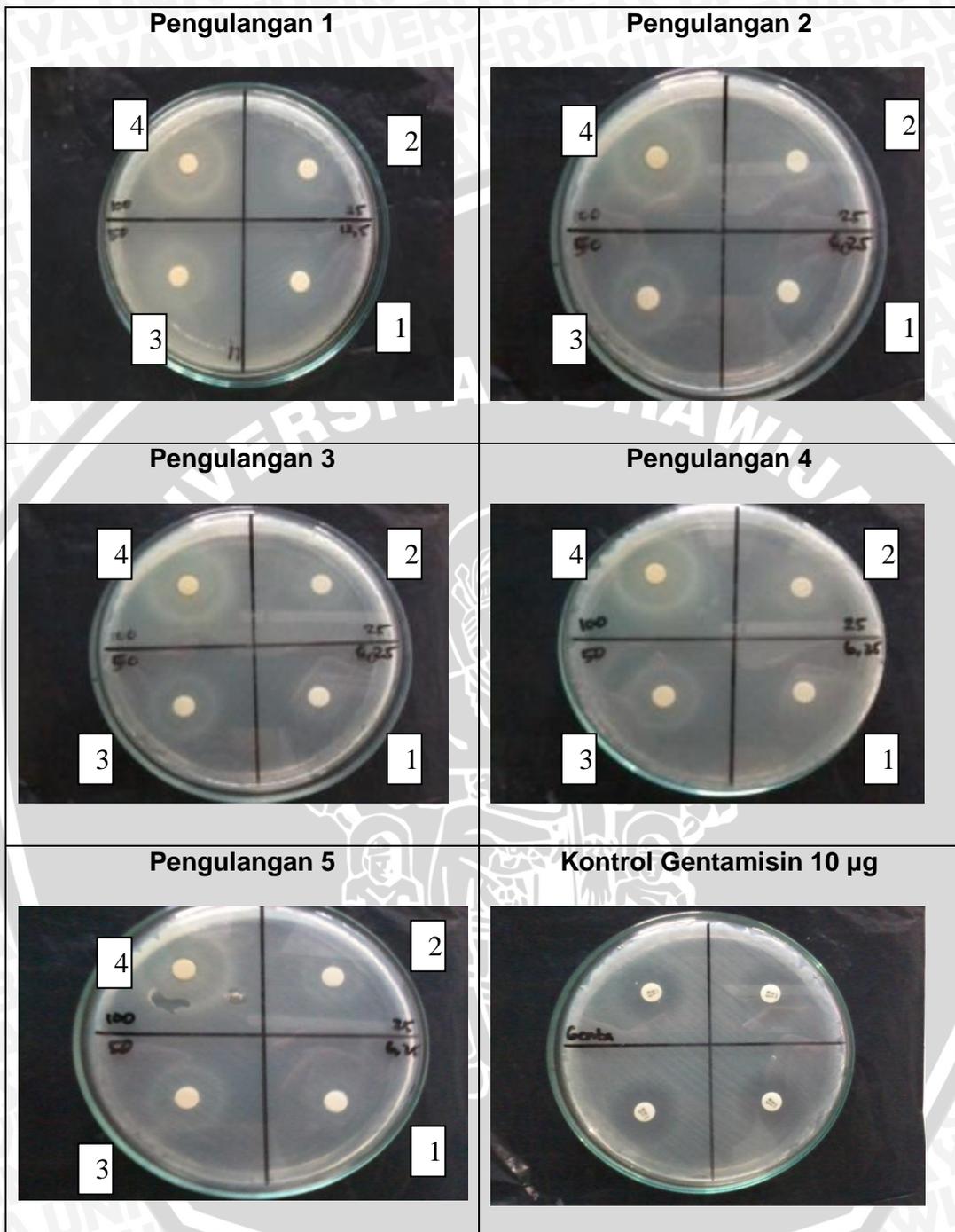
**Gambar 5.3 Hasil Ekstrak Metanol Madu**

Hasil ekstrak yang diukur aktivitas anti mikroba adalah fraksi kental etil asetat saja karena menurut Ida, *et al.* (2012) mengandung senyawa aktif *flavonoid*, sedangkan fraksi n-heksan hanya mengandung zat aktif yang larut dalam larutan non-polar dan ekstrak metanol-air mengandung zat yang tidak larut pada larutan non-polar dan polar. .

### 5.1.3 Hasil Uji Antimikroba

#### 5.1.3.1 Hasil Pengamatan Pertumbuhan *E. coli* pada medium

Ekstrak metanol madu dibuat dengan konsentrasi ekstrak 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Hasil pengamatan pada media pertumbuhan setelah diinkubasi 18-24 jam, yaitu:

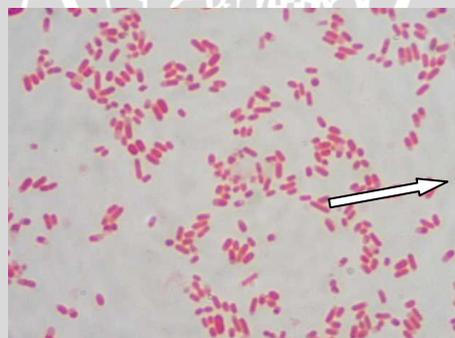


Gambar 5.4 Hasil Pengamatan pada Pengulangan 1, 2, 3, 4, 5 dan Kontrol

- Keterangan:
- 1 = konsentrasi 12,5 %
  - 2 = konsentrasi 25 %
  - 3 = konsentrasi 50 %
  - 4 = konsentrasi 100 %

Pada kelompok kontrol berisi cakram antibiotik gentamisin 10 µg terbentuk lingkaran zona berwarna bening disekitar cakram. Hal ini berarti gentamisin berdifusi dengan baik dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Pada kelompok perlakuan 1, 2, 3, 4, dan 5, terbentuk lingkaran berwarna lebih keruh daripada zona luar lingkaran dengan tepi seperti cincin. Hal ini berarti ekstrak di setiap perlakuan berdifusi dengan baik tetapi memberi efek pertumbuhan bakteri. Hasil rerata pengukuran zona difusi perlakuan dan kontrol dapat diketahui dari Tabel 5.1.

Kemudian dilakukan uji konfirmasi untuk memastikan tidak ada kontaminasi terhadap hasil perlakuan, dilakukan pengecatan Gram dan penanaman bakteri dengan media *EMB*. Bakteri yang diambil berasal dari zona dalam cincin. Hasil pengecatan Gram dapat dilihat di Gambar 5.6 dan penanaman pada media *EMB* pada Gambar 5.7.



Batang Gram negatif berwarna merah

Gambar 5.5 Pemeriksaan Mikroskopik *E.coli* Perbesaran 1000 x



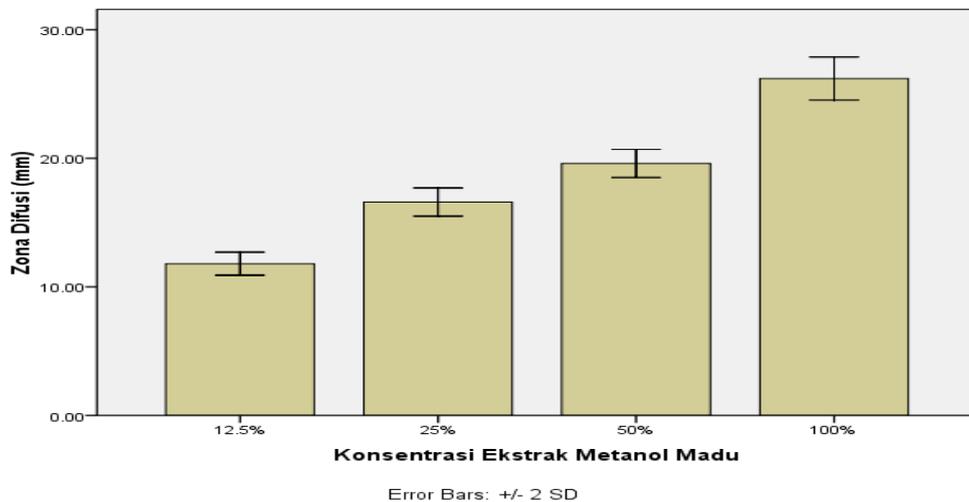
*E. coli* berwarna metallic sheen

Gambar 5.6 Pertumbuhan *E.coli* dalam media *Eosin Methylene Blue*

Pada awal penelitian telah dihipotesiskan bahwa kandungan yang ada dalam ekstrak metanol fraksi etil asetat madu dapat mencegah pertumbuhan *E. coli* yang terlihat dari zona bening di sekitar cakram, hal tersebut tidak terpenuhi karena terjadi pertumbuhan *E. coli* di sekitar cakram. Tampaknya pertumbuhan *E. coli* ditingkatkan oleh ekstrak metanol fraksi etil asetat madu terlihat dari kekeruhan zona difusi ekstrak. Hasil pengamatan kekeruhan zona difusi dapat dilihat pada Tabel 5.2.

**Tabel 5.1 Hasil Rerata Pengukuran Zona Difusi Gentamisin dan Ekstrak Metanol Fraksi Etil Asetat Madu Terhadap Pertumbuhan *E. coli* Pada Media NAP**

Kelompok	Pengulangan (mm)					Rerata $\pm$ SD (mm)
	1	2	3	4	5	
Kontrol	21	22	21	21	22	21,4 $\pm$ 0,54770
12,5%	12	12	11	12	12	11,8 $\pm$ 0,44721
25%	16	16	17	17	16	16,6 $\pm$ 0,54772
50%	19	20	20	20	19	19,6 $\pm$ 0,54772
100%	25	27	26	27	26	25,6 $\pm$ 0,83666



**Gambar 5.7** Rerata Zona Difusi Tiap Konsentrasi

Hasil rerata pengukuran zona difusi ekstrak metanol fraksi etil asetat madu, yaitu :  $11,8 \pm 0,44721$  mm untuk konsentrasi 12,5 %,  $16,6 \pm 0,54772$  mm untuk konsentrasi 25 %,  $19,6 \pm 0,54772$  mm untuk konsentrasi 50 %, dan  $25,6 \pm 0,83666$  mm untuk konsentrasi 100%.

**Tabel 5.2** Hasil Pengamatan Kekerusan Zona Difusi Gentamisin dan Ekstrak Metanol Fraksi Etil Asetat Madu Terhadap Pertumbuhan *E. coli* Pada Media NAP

Kelompok	Pengulangan				
	1	2	3	4	5
Kontrol	0	0	0	0	0
12,5%	+1	+1	+1	+1	+1
25%	+2	+1	+2	+2	+2
50%	+3	+3	+3	+3	+3
100%	+4	+4	+4	+4	+4

Keterangan: Skor 0 = bening  
 Skor +1 = kurang keruh  
 Skor +2 = cukup keruh  
 Skor +3 = keruh

Skor +4 = sangat keruh

## 5.2 Analisa Data

Hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan fasilitas program SPSS 16. Pada penelitian ini digunakan uji parametrik. Analisis yang digunakan adalah Anova (analisis ragam), spesifiknya yaitu dengan *One Way Anova*.

Syarat pertama sebelum uji *Anova* adalah uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan homogenitas variasi data. Uji normalitas untuk memperlihatkan bahwa data sampel berasal dari populasi yang berdistribusi normal. Hasil uji normalitas (Lampiran 1) didapatkan nilai signifikansi 0.056 ( $p > 0.05$ ) yang berarti data berdistribusi normal. Uji homogenitas dimaksudkan untuk memperlihatkan bahwa dua kelompok atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama. Hasil uji homogenitas varian (Lampiran 1) didapatkan nilai signifikansi 0.341 ( $p > 0.05$ ) yang berarti variansi setiap sampel sama.

Setelah kedua syarat terpenuhi, dilakukan analisis *one-way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan nyata antara konsentrasi ekstrak terhadap zona difusi ekstrak. Hasil uji *one-way ANOVA* (Lampiran 2) didapatkan angka 0,000 ( $p < 0.05$ ). Hal ini berarti efek perubahan konsentrasi ekstrak metanol madu terhadap zona difusi adalah berbeda secara signifikan pada taraf kepercayaan 95 %.

Uji *Post Hoc Tukey* merupakan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*). Uji ini menunjukkan pasangan kelompok sampel yang memberikan perbedaan yang signifikan. Dari hasil uji *Post Hoc Tukey* (Lampiran 2) dapat diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan disetiap pasangan kelompok sampel yang ditunjukkan oleh angka signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa antar konsentrasi berbeda secara signifikan.

Pada Tabel 5.3 Hasil *Homogeneous Subsets* akan diketahui subset yang mempunyai perbedaan reratanya yang tidak signifikan. Pada *Homogeneous Subsets* ini empat kelompok sampel masuk ke dalam empat *subset*. Pada *subset* 1 diisi oleh kelompok sampel konsentrasi 12,5%. Hal ini berarti kelompok konsentrasi 12,5% memiliki perbedaan rerata yang signifikan terhadap setiap kelompok lainnya. Pada *subset* 2 diisi oleh kelompok sampel dengan konsentrasi 25%. Hal ini berarti kelompok konsentrasi 12,5% memiliki perbedaan rerata yang signifikan terhadap setiap kelompok lainnya. Pada *subset* 3 diisi oleh kelompok sampel dengan konsentrasi 50%. Hal ini berarti kelompok konsentrasi 50% memiliki perbedaan rerata yang signifikan terhadap setiap kelompok lainnya. Pada *subset* 4 diisi oleh kelompok sampel dengan konsentrasi 100 %. Hal ini berarti kelompok kontrol 100% memiliki perbedaan rerata yang signifikan terhadap setiap kelompok lainnya. Hasil pada *Homogeneous Subsets* sesuai dengan hasil yang telah didapat pada uji *Post Hoc Tukey*.

**Tabel 5.3 Hasil *Homogeneous Subsets***

Zona					
Tukey HSD					
Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
12.5%	5	11.8000			
25%	5		16.6000		
50%	5			19.6000	
100%	5				26.2000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uji Korelasi *Pearson* (Lampiran 3) menunjukkan angka signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian

ekstrak metanol madu dengan zona difusi. Besar koefisien korelasi Pearson yaitu  $R = 0,984$ . Tanda positif menunjukkan hubungan lurus yaitu bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak metanol madu maka semakin luas zona difusi, dan sebaliknya.

Analisis Regresi (Lampiran 3) digunakan untuk menentukan model yang paling sesuai untuk pasangan data serta dapat digunakan untuk membuat model dan menyelidiki hubungan antara dua variabel atau lebih. Dalam penelitian ini uji regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan kemampuan difusi.

Koefisien determinasi R Square ( $R^2$ ) sebesar 0,967 menyatakan besarnya derajat keeratan hubungan antara konsentrasi ekstrak metanol madu dengan zona difusi yaitu 96,7%. Hal ini berarti kontribusi pemberian ekstrak dalam melebarkan zona difusi sebesar 96,7% sedangkan sisanya 3,3% disebabkan oleh faktor-faktor lain yang tidak diteliti. Hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak dengan luas zona difusi dapat dinyatakan dengan rumus  $y = 7,000 + 4,620x$ .  $y$  adalah zona difusi, sedangkan  $x$  adalah konsentrasi ekstrak metanol madu fraksi etil asetat. Hal ini berarti hubungan konsentrasi terhadap zona difusi mempunyai hubungan positif artinya dengan penambahan konsentrasi ekstrak terjadi perluasan zona difusi. Hasil persamaan tersebut dapat dilihat dalam grafik persamaan linier pada Lampiran 3.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak metanol fraksi etil asetat madu sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) secara *in vitro*. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui hubungan ekstrak metanol fraksi etil asetat madu dengan pertumbuhan *E. coli* melalui metode difusi cakram.

*E. coli* merupakan bakteri berbentuk batang, bersifat Gram negatif berwarna merah. Hal tersebut ditunjukkan oleh Gambar 5.1. *E. coli* termasuk dalam keluarga Enterobacteriaceae yang tidak membentuk spora dan bisa dibedakan dengan spesies lain dari keluarga Enterobacteriaceae dengan media *eosin methylen blue*. *E. coli* akan memberikan gambaran spesifik pada media *EMB* berupa gambaran *metallic sheen*. Hal tersebut sesuai dengan Gambar 5.2.

*E. coli* juga merupakan bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi saluran kemih dan infeksi nosokomial (Noviana, 2004). Meskipun *E. coli* merupakan flora normal, namun terdapat galur patogen yang dapat menyebabkan penyakit seperti hal tersebut diatas. Galur yang menyebabkan penyakit, antara lain: *enteropathogenic E. coli* (*EPEC*), *enterotoxigenic E.coli* (*ETEC*), *enterohemorrhagic E. coli* (*EHEC*), *enteroinvasive E. coli* (*EIEC*), *diffuse-adhering E. coli* (*DAEC*), dan *enteroaggregative E. coli* (*EAEC*). Selain itu, terdapat *E. coli* yang menyebabkan saluran kemih, yaitu *uropathogenic E. coli* (*UPEC*). Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini tidak spesifik menggunakan galur-galur patogen tersebut di atas sehingga galur yang digunakan dimungkinkan berasal dari galur yang sama atau berbeda.

Sampel madu yang digunakan pada penelitian ini adalah madu hutan multifloral sebanyak 50 gram (40 mL). Madu jenis yang digunakan mempunyai kadar air 18 %. Madu yang mempunyai kadar air yang tinggi lebih dari 25 % akan mengalami perubahan rasa dan perubahan keasaman sehingga akan mempengaruhi hasil akhir penelitian ini.

Ekstraksi madu menggunakan ekstraksi maserasi dan cair-cair yang merupakan peristiwa pemindahan massa zat aktif yang ditarik oleh pelarut sehingga terjadi larutan zat aktif dalam pelarut. Pada saat pencampuran terjadi perpindahan massa, yaitu ekstrak meninggalkan pelarut yang pertama (media pembawa) dan masuk ke dalam pelarut kedua (media ekstraksi). Dalam penelitian ini digunakan tiga pelarut yang berbeda kepolarannya, yaitu pelarut metanol, n-heksan dan etil asetat. Tujuan menggunakan pelarut selain metanol agar semua senyawa aktif yang bersifat non polar dan polar dapat ditarik tergantung tingkat kepolarannya. Pelarut metanol yang bersifat polar yang berspektrum luas akan menarik sebagian besar bahan aktif dalam madu. Supernatan yang terbentuk dari pelarut metanol kemudian dipartisi menggunakan n-heksan yang bersifat non polar sehingga bahan aktif non polar bisa teraik ke n-heksan. Partisi ini membentuk dua lapisan yaitu n-heksan dan metanol-air. Selanjutnya bahan metanol-air dipartisi lagi menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semipolar. Hasil akhir partisi ini berupa lapisan etil asetat dan metanol-air. Sebagian besar bahan aktif tertarik pada etil asetat dan komponen yang ada pada metanol-air hanya bahan yang tidak larut dalam senyawa polar dan non-polar (Ida, *et al.*, 2012). Hasil ekstraksi diperlihatkan pada Gambar 5.3.

Penelitian ini menggunakan ekstrak kental etil asetat karena diasumsikan mengandung sebagian besar bahan aktif madu. Penelitian Ida, *et al.* (2012), fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid yaitu isoflavon, tetapi tidak mengandung senyawa *saponin*. Sedangkan tannin dan terpenoid, tidak dilaporkan ada dalam fraksi etil asetat.

Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak metanol madu dilakukan terhadap bakteri *E. coli* menggunakan metode difusi cakram. Terbentuknya zona bening disekitar cakram menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji. Diameter zona penghambatan bakteri diukur dan dibandingkan dengan diameter zona penghambatan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif berupa antibiotik gentamicin. Kontrol negatif berupa n-heksan dan etil asetat dengan tujuan untuk memastikan bahwa zona hambat ekstrak yang dihasilkan bukan pengaruh dari pelarut, tetapi murni dari senyawa aktif dalam ekstrak tersebut. Namun, penelitian ini tidak menggunakan kontrol negatif dikarenakan keterbatasan dalam ketersediaan bahan tersebut.

Sebelum dimulai penelitian, dilakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu. Pada dasarnya penelitian pendahuluan hanya bertujuan untuk menentukan dosis yang akan digunakan dalam penelitian. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian yaitu 12,5%, 25%, 50% dan 100%.

Pada kelompok kontrol dan perlakuan dengan berbagai macam konsentrasi terbentuk zona lingkaran disekitar cakram yang berarti gentamicin dan ekstrak berdifusi dengan baik ke dalam media. Hal tersebut diperlihatkan pada Gambar 5.4. Pada Tabel 5.1 Hasil rerata pengukuran zona difusi gentamisin dan ekstrak metanol madu, yaitu :  $21,4 \pm 0,54770$  mm untuk

gentamisin,  $11,8 \pm 0,44721$  mm untuk konsentrasi 12,5 %,  $16,6 \pm 0,54772$  mm untuk konsentrasi 25 %,  $19,6 \pm 0,54772$  mm untuk konsentrasi 50 %, dan  $25,6 \pm 0,83666$  mm untuk konsentrasi 100%.

Uji statistik yang digunakan adalah Uji *One-Way* ANOVA, Uji Korelasi dan Uji Regresi. Dari Uji ANOVA didapatkan nilai signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan efek pada pemberian tiap konsentrasi ekstrak mananol madu terhadap zona difusi. Sedangkan hasil dari Uji *Post Hoc Tukey* dapat diketahui bahwa setiap konsentrasi memiliki perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi yang lain, yang ditunjukkan oleh angka signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ).

Dari uji korelasi didapatkan angka signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat hubungan bermakna antara pemberian konsentrasi ekstrak metanol madu dengan zona difusi. Besar koefisien korelasi yaitu  $R = 0,984$ . Tanda positif menunjukkan hubungan antara variabel berbanding lurus yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak metanol madu maka semakin luas zona difusi, dan sebaliknya.

Pada uji regresi didapatkan koefisien determinasi *R Square* ( $R^2$ ) sebesar 0,967. Angka ini menunjukkan besarnya derajat keeratan hubungan antara konsentrasi ekstrak metanol madu dengan zona difusi yaitu 96,7%. Hal ini berarti kontribusi pemberian ekstrak dalam melebarkan zona difusi sebesar 96,7% sedangkan sisanya 3,3% disebabkan oleh faktor-faktor lain yang tidak diteliti. Hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak dengan luas zona difusi dapat dinyatakan dengan rumus  $y = 7,000 + 4,620x$ .  $y$  adalah zona difusi sedangkan  $x$  adalah konsentrasi ekstrak madu. Hal ini berarti hubungan konsentrasi terhadap

zona difusi mempunyai hubungan positif artinya dengan penambahan konsentrasi ekstrak terjadi perluasan zona difusi.

Pada kelompok kontrol gentamisin terbentuk zona bening atau zona hambat pertumbuhan bakteri, hal ini berarti bahwa gentamicin mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*. Pada kelompok perlakuan terbentuk zona berbentuk seperti cincin. Di dalam cincin pertumbuhan *E. coli* lebih cepat daripada diluar cincin, ditandai dengan tingkat kekeruhan zona. Pada Tabel 5.2 diperlihatkan hasil pengamatan kekeruhan zona difusi ekstrak metanol madu terhadap pertumbuhan *E. coli*. Semakin tinggi dosis, semakin keruh zona difusi. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol madu memicu pertumbuhan bakteri pada seluruh area yang terkena ekstrak metanol madu. Konsentrasi yang menunjukkan tingkat pertumbuhan tinggi pada konsentrasi 100%. Jumlah koloni tidak dihitung. Ekstrak metanol madu fraksi etil asetat tidak menghambat pertumbuhan *E. coli*.

Untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh adalah *E. coli* dan bukan kontaminan, maka dilakukan uji identifikasi ulang berupa pengecatan Gram dan penanaman pada media *EMB*. Hasil konfirmasi ulang menunjukkan batang Gram negatif berwarna merah dan gambaran *metallic sheen*. Hasilnya ditunjukkan pada Gambar 5.5 dan 5.6.

Fakta terjadi pertumbuhan *E. Coli* yang terkena difusi ekstrak dalam penelitian ini diduga karena efek dari senyawa-senyawa kimia aktif yang berasal dari ekstrak metanol madu itu sendiri. Menurut Alka, *et al.* (2011), isoflavon dapat menghambat pertumbuhan spesies bakteri *Stapylococci*, *Streptococci*, *Actinomyces* dan *Labtobacillus*. Berbeda dengan spesies bakteri di atas, isoflavon gagal untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* walaupun pada

pemberian konsentrasi tinggi. Hal tersebut diperkirakan karena membran luar *E. coli* mencegah masuknya isoflavon ke membran protoplasma. Hal ini sejalan dengan penelitian Verdrengh, *et al.* (2004).

Mekanisme kegagalan isoflavon dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*, antara lain target utama isoflavon pada *E. coli* adalah DNA gyrase. Isoflavon berhasil menghambat pertumbuhan bakteri jika target utama isoflavon adalah *topo II-targeted drugs* (Alka, *et al.* 2011). Aktivitas isoflavon lebih kuat untuk menghambat pada aktivitas *topo IV* dibandingkan DNA gyrase. Isoflavon menghambat DNA gyrase secara parsial. (Cruhnie and Lamb, 2006).

DNA *topoisomerase (topo)* adalah enzim yang mengkatalisis perubahan topologi DNA. Enzim ini penting untuk bertahan hidup bagi bakteri. Dikarenakan peranannya sangat penting, maka *topo* menjadi sasaran kunci obat antimikroba. DNA *topo* dibagi menjadi dua tipe, I dan II, tergantung reaksi katalisis pada satu rantai DNA (tipe 1) atau keduanya (tipe 2). DNA gyrase termasuk tipe 2 (Frederic, *et al.* 2011). Golongan obat fluoroquinolon dapat menghambat secara total DNA gyrase sehingga mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*.

Penelitian Katarzyna, *et al.* (2006), pengujian untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* gagal setelah diuji dengan semua jenis flavonoid yang digunakan. Baik secara morfologi sel, sintesis asam nukleik dan sintesis protein *E. coli*, tidak terpengaruh oleh adanya senyawa isoflavon.

Selain isoflavon, dalam fraksi etil asetat ekstrak metanol madu juga terdapat senyawa aktif beta karoten (Oka, *et al.*, 2010; Ida, *et al.*, 2012) dan ekstrak madu juga mengandung tokoferol (Adetuyi, *et al.*, 2009). Beta karoten mempunyai pengaruh terhadap pertumbuhan *E. coli*. Pada penelitian Hino, *et al.* (1993), beta karoten dapat mengembalikan kemampuan pertumbuhan bakteri

setelah bakteri tersebut diberi minyak *safflower* sebagai antimikroba. Kandungan dalam *safflower* adalah  $\alpha$  tokoferol yang bekerja addiktif dengan beta karoten. Kombinasi dari kedua senyawa tersebut dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri secara signifikan.

*E. coli* dimungkinkan menggunakan beberapa bahan sebagai sumber energi dan mempergunakan unsur-unsur penting mempercepat metabolisme bakteri. Senyawa yang dapat berperan sebagai sumber energi adalah gula terlarut dan asam asetat. *E. coli* mempunyai kemampuan untuk memanfaatkan beberapa komponen tersebut sebagai sumber karbon. Glukosa merupakan sumber energi utama dan mekanisme pemanfaatannya tergantung dari *phosphoenolpyruvat: carbohydrate phopho-transferase system (PTS)*. *PTS* tidak hanya mengangkut gula spesifik tetapi juga saat tidak ada bahan tersebut melalui adenylate cyclase (Cya), produksi cAMP yang akan mengaktifkan transkripsi banyak gen katabolik bergantung cAMP-CRP (Gomez *et al.*, 2012). *E. coli* mempunyai suatu enzim bernama *phosphoenolpyruvate carboxylase* yang dapat mempercepat reaksi terbentuknya oxaloacetat dan fosfat. Terbentuknya bentuk ini akan menyumbang karbon dan mendukung pertumbuhan bakteri *E. coli* (Prescott, 2002).

Dari pernyataan diatas, diasumsikan bahwa bahan-bahan yang berperan sebagai antimikroba dalam ekstrak metanol madu fraksi etil asetat tidak mampu melawan pertumbuhan *E. coli* tetapi menyediakan faktor pertumbuhan yang esensial bagi *E. coli*. Jika asumsi ini benar, dapat dinyatakan bahwa semakin tinggi ekstrak metanol madu, pertumbuhan *E. coli* akan semakin cepat.

Beberapa penelitian yang berhubungan dengan madu telah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan Mohapatra, *et al.* (2012) bahwa ekstrak

metanol madu menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap pertumbuhan *E. coli* secara signifikan dengan luas zona hambat sebesar 26.49 mm dibandingkan dengan kontrol positif ciprofloxacin 16.67 mm dan tetracyclin 16.03 mm. Penelitian tersebut mengambil kesimpulan bahwa madu mempunyai aktivitas antimikroba (efek bakterostatik dan bakteriosidal) sehingga dapat digunakan sebagai pengganti antibiotik terhadap bakteri tertentu. Pada penelitian yang dilakukan Cooper, *et. al.* (2002) menunjukkan bahwa madu mempunyai sensitifitas terhadap bakteri Gram positif, bakteri yang sensitif atau resisten terhadap antibiotik .

Berdasarkan hasil penelitian uji efek antimikroba ekstrak metanol madu terhadap bakteri *E. coli* secara *in vitro* yang telah dilakukan dan dianalisis serta diperkuat dengan bukti-bukti penelitian yang terkait, maka dapat ditarik kesimpulan, bahwa ekstrak metanol madu memiliki kemampuan berdifusi luas dan mempercepat pertumbuhan bakteri. Semakin tinggi konsentrasi madu, maka semakin luas zona difusi dan makin tinggi tingkat pertumbuhan bakteri *E. coli* . Dengan demikian, hipotesis penelitian belum terpenuhi.

Walaupun hasilnya cukup bermakna, tentunya penelitian ini tetap memiliki kelemahan, yaitu kemungkinan adanya kesalahan teknis. Walaupun demikian penelitian ini cukup bermanfaat untuk dijadikan masukan baru atau informasi tambahan bagi penelitian-penelitian berikutnya.

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

7.1.1 Secara in vitro, Ekstrak metanol fraksi etil asetat madu memiliki pengaruh meningkatkan pertumbuhan *E. coli*, bukan menghambat pertumbuhan *E. coli*. Semakin tinggi konsentrasi madu, maka semakin luas zona difusi dan makin tinggi pertumbuhan bakteri *E. coli*.

7.1.2 Tidak ditemukan KHM

#### 7.2 Saran

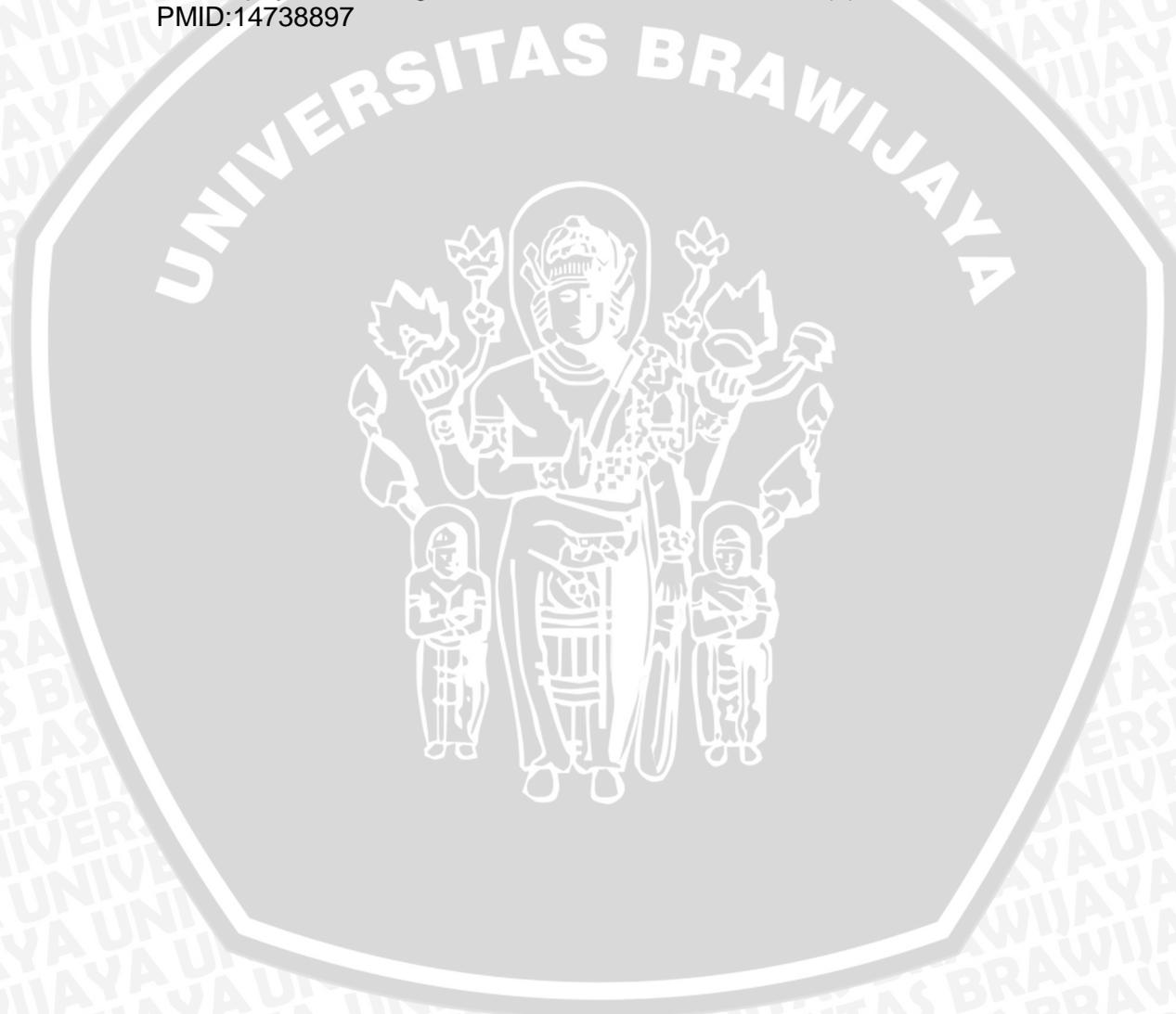
Diperlukan penelitian lanjutan mengenai efek ekstrak metanol fraksi etil asetat madu terhadap pertumbuhan bakteri lain agar dapat dimanfaatkan sebagai suplemen pertumbuhan bakteri di Laboratorium Mikrobiologi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adetuyi FO, Ibrahim TA, Jude O, Ogundahunsi GA. *Total phenol, tocopherol and antibacterial quality of honey Apis mellifera sold in Owo community, Ondo State, Nigeria*. African Journal of Biotechnology Vol. 8(7),pp. 1305-1309, 6 April, 2009 ISSN 1684-5315
- Adji S. 2004. *Khasiat dan Manfaat Madu Herbal*. Jakarta:Agromedia Pustaka
- Alka PM, Vivek V, Avinash GP. *Structure pre-requisites for isoflavone as effective antibacterial agents*. Pharmacogn Rev. 2011 Jan-Jun;5(9):13-18.PMCID:PMC3210004
- Baron EJ, Peterson L.R., Finegold S.M. 1994. *Bailey&Scott's Diagnostic Microbiology 9<sup>th</sup> edition*. Missouri: Mosby-Year Book.Inc. Halaman 69-70, 100-104, 170-178
- Cooper RA, Molan PC, Harding KG. *The Sensitivity of Honey of Gram-positive cocci and Clinical Significance isolated from Wounds*. Journal of Applied Microbiology 2002, 93, 857-863
- Cushnie TP, Lamb AJ. *Antimicrobial activity of flavonoids*. Int J Antimicrob Agents. 2005 Nov;26(5):343-56. Review. Erratum in: Int J Antimicrob Agents. 2006 Feb;27(2):181. PubMed PMID: 16323269
- de Sousa PC. *Escherichia coli as a Specialized Bacterial Pathogen*. Revista De Biologia E Ciencias Da Terra. Volume 6-Numero 2-2 Semestre 2006. ISSN 1519-5228
- Depkes RI. 2007. *Profil Kesehatan Indonesia 2006*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Dzen S.M., Roekitiningih, Santoso S., Winarsih S. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedia Publishing. Halaman 58-59, 132-141
- Frederic C, Shantanu K, Anthony M. *Exploiting bacterial DNA gyrase as a new drug: current state and perspectives*. Appl Microbiol Biotechnol. 2011 November; 92(3) 479-497. PMCID: PMC3189412
- Ge B., Bodei S., Walker R.D., White D.G., Zhao S., McDermott F.P., Meng J. 2002. Comparison of the Etest and agar dilution for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. <http://jac.oxfordjournals.org/content/50/4/487.full>. Diakses tanggal 8 Januari 2012 pukul 09.00 WIB
- Gomez M, Flores N, Castaneda H.M., Batallar G.M., Chavez G. H, Ramirez O.T, et al. *New Insight Into Escherichia coli Metabolism: Carbon Scavenging, Acetat Metabolism and Carbon Recycling Responses During Growth on Glycerol*. Microbial cell Factories 2012, 11:46 <http://www.microbialcellfactories.com/11/1/46>
- Haynes JS. and Callaghan R. *Properties of Honey:its Mode of Action and Clinical Outcomes*. Clinical Review, Wound UK, 2011, Vol 7, No1

- Hino T, Andoh N, Ohgi H. *Effects of beta-carotene and alpha-tocopherol on rumen bacteria in the utilization of long-chain fatty acids and cellulose*. J Dairy Sci. 1993 Feb;76(2):600-5. PubMed PMID: 8445103.
- ICS-UNIDO. 2008. *Extraction Technologies for Medical and Aromatic Plant*. Trieste: Earth, Environmental and Marine Science and Technologies International Centre for Science and High Technology ICS-UNIDO
- Ida A R A, Ketut R, Ida B S. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Madu Kelengkeng (Nephelium longata L)*. Jurnal Kimia 6(1), Januari 2012 : 72-78
- Jawetz E., Levinson E. W. 1995. *Medical Microbiology and Immunology*. New York: Lange Medical Book.
- Kamaruddin. 2002. *Khasiat Madu*. Departement of Biochemistry, Fakultas of Medicine, University of Malaya, Kualalumpur. Artikel vision net
- Katarzyna U, Tkaczyk A, Konopa G, Wegrzyn G. *Diffrensial antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA protein syntesis insome bacterial strains*. Journal: Archive of Microbiology-ARCH MICROBIOL, vol. 184, pp. 271-278, 2006
- Katzung B G. 2007. *Basic & Clinical Pharmacology Tenth Edition*. New York: McGraw-Hill Companies
- Malhotra DP, Thakur V, Brar KS. *Research Artikel Antibacterial Efficacy of raw and Processed Honey*. SAGE-hindawi Access to Research Biotechnology Research International Volume 2011, Artikel ID 917505, 6 pages
- Noviana H. *Pola Kepekaan Antibiotika Escherichia coli Yang Diisolasi dari Berbagai Spesimen Klinis*. Jurnal Kedokteran Trisakti. Oktober-Desember 2004, Vol. 23 No.4
- Oka A, Ratnayani R, dan Ana L. *Aktivitas antiradikal bebas serta kadar beta karoten pada madu randu (Ceiba pnetandra) dan madu kelengkeng (Nephelium longata L.)*. Jurnal kimia 4 (1), Januari 2010 : 54-62
- Prescott LM., Harley JP., Klein DA. 2002. *Microbiology 5<sup>th</sup> ed*. New York :McGraw-Hill Publishing Company.
- Pusat Data dan Informasi Perhimpunan Rumah Sakit Seluruh Indonesia (PDPERSI). 2005. *Obat Tradisional Seledri*. <http://www.pdpersi.co.id/?show=detailnews&kode=1026&tbl=alternatif>. Diakses tanggal 22 November 2010 pukul 20.00 WIB.
- Rahman MM, Richardson A, Aziru MS. *Antibacterial Activity of Propolis and Honey Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. African Journal Of Microbiology Research Vol.4(16) pp. 1872-1878, 18 September, 2010
- Ryan KJ and Ray CG. 2004. *Sherris Medical Microbiology An Introduction to Infectious Disease 4<sup>th</sup> Edition*. New York: McGraw-Hill
- Sockett, D. C. and Valley, A. 2006. *Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory. <http://www.Orapinker.com>. Diakses tanggal 27 Januari 2012 pukul 20.00 WIB.

- Solimun. 2001. *Diklat Metodologi Penelitian LKIP&PKM Kelompok Agrokompleks*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Sri A. 2009. *Karya Ilmiah Penentuan Kualitas Madu Komersia*. Bandung: Universitas Padjadjaran
- Sri A. 2010. *Makalah Escherichia coli*. Bandung: Universitas Padjadjaran
- Winarno, PG. 1981. *Madu "Teknologi Kahisat dan Analisa"*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Institut Pertanian Bogor
- Verdreng M, Collins LV, Bergin P, Tarkowski A. *Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent*. *Microbes Infect.* 2004 Jan;6(1):86-92. PubMed PMID:14738897



LAMPIRAN 1

UJI NORMALITAS DAN HOMOGENITAS

1. Uji Normalitas Sebaran Data

Untuk menguji apakah sampel penelitian mempunyai sebaran data yang normal, maka dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk* terhadap tiap-tiap variabel.

Tests of Normality						
Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>	Shapiro-Wilk				
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df
Zona 12.5%	.473	5	.001	.552	5	.000
25%	.367	5	.026	.684	5	.006
50%	.367	5	.026	.684	5	.006
100%	.231	5	.200*	.881	5	.314

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

Tests of Normality						
Konsentrasi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Zona	.144	20	.200*	.907	20	.056

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

Nilai signifikansi = 0,056 ( $p > 0,05$ ) yang berarti bahwa distribusi data normal.



## 2. Uji Homogenitas Variansi Data

Test of Homogeneity of Variance

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zona Based on Mean	1.202	3	16	.341
Based on Median	.485	3	16	.698
Based on Median and with adjusted df	.485	3	15.613	.698
Based on trimmed mean	1.319	3	16	.303

Nilai signifikansi = 0,341 ( $p > 0,05$ ) yang berarti data mempunyai ragam (varians) yang relatif homogen.



## LAMPIRAN 2

## UJI ANOVA

## One-Way

## ANOVA

Zona	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	544.950	3	181.650	484.400	.000
Within Groups	6.000	16	.375		
Total	550.950	19			

Nilai signifikansi = 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang berarti bahwa ada perbedaan signifikan pada perubahan konsentrasi

LAMPIRAN 3  
UJI KORELASI DAN REGRESI

Correlations

		Zona	Konsentrasi
Pearson Correlation	Zona	1.000	.984
	Konsentrasi	.984	1.000
Sig. (1-tailed)	Zona	.	.000
	Konsentrasi	.000	.
N	Zona	20	20
	Konsentrasi	20	20

Regression

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.984 <sup>a</sup>	.969	.967	.98150

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	533.610	1	533.610	553.920	.000 <sup>a</sup>
	Residual	17.340	18	.963		
	Total	550.950	19			

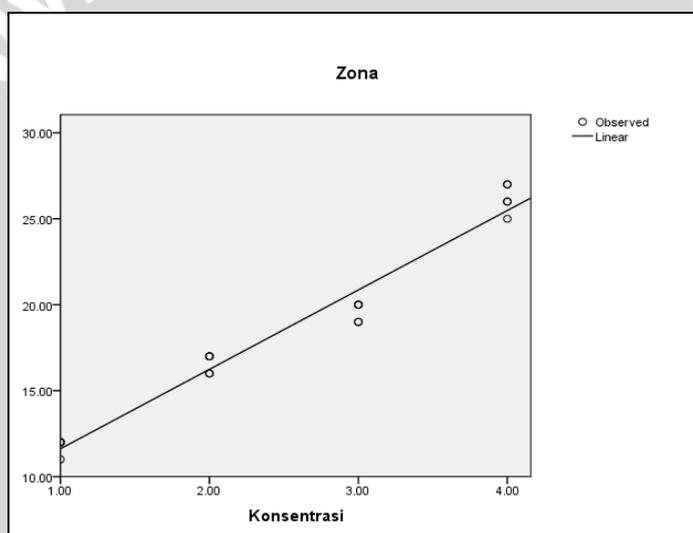
a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

b. Dependent Variable: Zona

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	7.000	.538		13.021	.000
	Konsentrasi	4.620	.196	.984	23.536	.000

a. Dependent Variable: Zona



## LAMPIRAN 4

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Agil Dananjaya

NIM : 0910710029

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan Tugas Akhir ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Februari 2013

Yang Membuat Pernyataan,

Agil Dananjaya

0910710029