

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*
var. assamica) SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella* Typhi
SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN METODE SUMURAN**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Devina Teresa

NIM. 155070100111048

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR
**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*
var. assamica) SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella* Typhi
SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN METODE SUMURAN**

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh :

Devina Teresa

155070100111048

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 26 Oktober 2018

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Rahmad, Sp. KFR

NIP. 198310112009121002

Pembimbing I/Penguji II

Pembimbing II/ Penguji III

Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt.

NIP. 196312171989112001

dr. Dian Sukma, Sp.PK, M.Biomed

NIP/NIK. 1985040920091210003

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)

NIP. 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Devina Teresa

NIM : 155070100111048

Program Studi : Sarjana Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

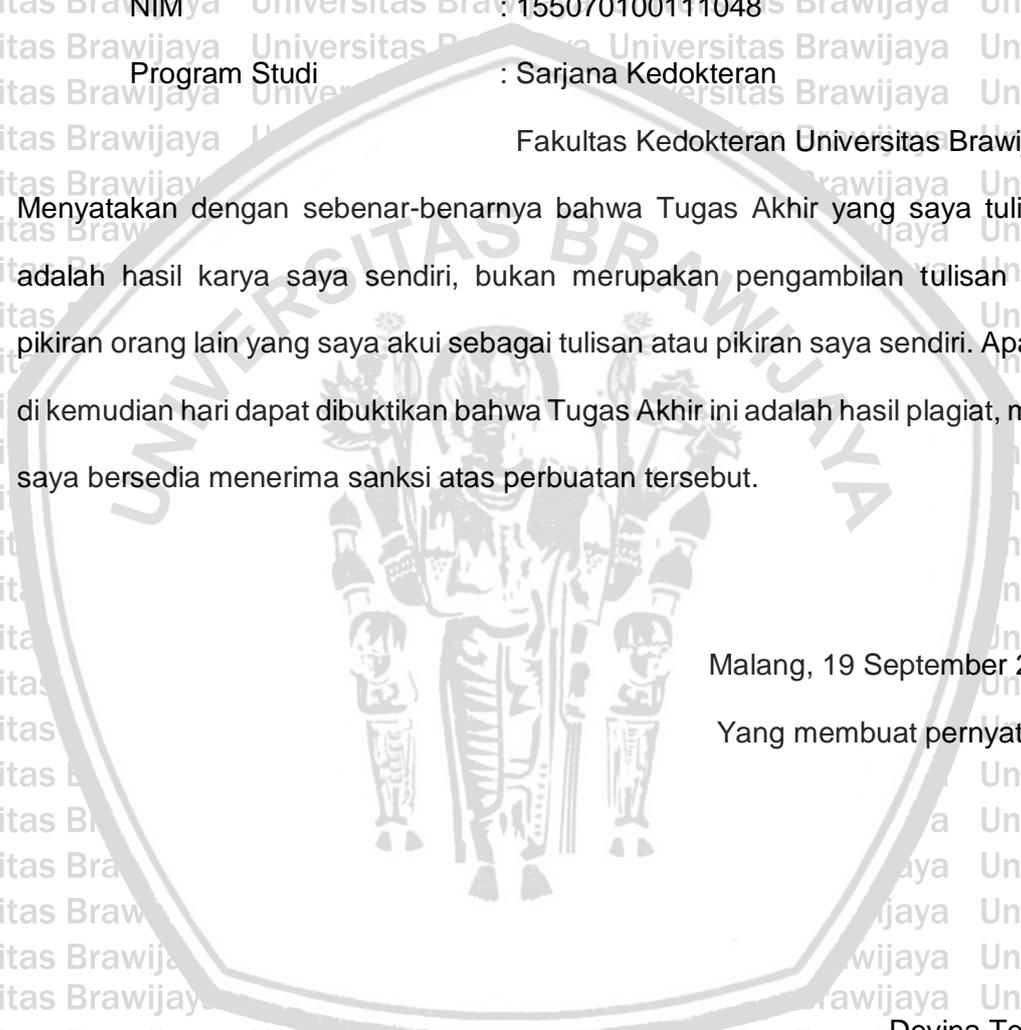
Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 19 September 2018

Yang membuat pernyataan,

Devina Teresa

NIM. 155070100111048



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis sampaikan kepada Tuhan yang Maha Esa atas segala penyertaannya kepada penulis selama menempuh studi di Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya sehingga tugas akhir berjudul "**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis var. assamica*) SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella Typhi* SECARA *IN VITRO* MENGGUNAKAN METODE SUMURAN**" dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini pula, ijinkan penulis untuk menyampaikan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. **Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes.**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. **dr. Triwahju Astuti, M.Kes.,Sp.P(K).**, selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. **Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt.**, selaku dosen pembimbing pertama yang telah berkenan untuk meluangkan waktunya dan dengan sangat peduli membimbing serta mengarahkan penulis dalam penulisan tugas akhir ini.
4. **dr. Dian Sukma, Sp.PK, M.Biomed**, selaku dosen pembimbing kedua yang banyak memberikan masukan dan dukungan selama penulisan tugas akhir ini.
5. **dr. Rahmad, Sp. KFR** yang telah meluangkan waktunya untuk menguji tugas akhir ini.
6. Kedua orang tua saya yang saya banggakan. **Drs. Ferry, Apt.** dan **Lisa Pollinawaty S.H.**, atas doa dan semangat yang terus diberikan, hingga saat ini.
7. Adik yang selalu memberi keceriaan di hari-hari saya, **Vicky Felisa.**

8. Sahabat-sahabat yang saya dapatkan selama perkuliahan di Pendidikan Dokter FKUB. **Gaby, Dysi, Shaza, Alin, Thea, Alfred, Adolf, Tito, dan Yusuf** atas kebersamaan selama kuliah pre-klinik.

9. Teman-teman *Executive Board*, **Donni, Hafidh, Beatrice, Ira, dan Andi**, yang sama-sama berjuang untuk mempertahankan kualitas lembaga tercinta kami, AMSA-Brawijaya.

10. Teman-teman penelitian saya yang selalu hadir untuk bertukar pikiran mengenai tugas akhir. **Hadi, Kukuh, James, dan Rafi**.

11. **Pak Ali**, selaku analis Laboratorium Mikrobiologi yang telah membantu penulis selama proses penelitian.

12. Kakak dan adik tingkat yang saya temui di Pendidikan Dokter FKUB atas kegembiraan dan semangat selama kuliah pre-klinik.

13. Dan semua pihak yang telah membantu menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga Tuhan memberkati kebaikan Anda sekalian!

Akhir kata, penulis menyadari bahwa tiada gading yang tak retak. Penulis sadar bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang dapat membangun sangat penulis harapkan. Semoga tugas akhir ini dapat diterima dan akan bermanfaat khususnya bagi pembaca yang membutuhkannya.

Malang, 19 September 2018

Penulis

ABSTRAK

Teresa, Devina. 2018. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (*Camellia Sinensis var. assamica*) sebagai Antibakteri terhadap *Salmonella Typhi* secara *In Vitro* menggunakan Metode Sumuran. Tugas Akhir. Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt (2) dr. Dian Sukma, Sp.PK, M. Biomed.

Pada studi yang dilakukan WHO tahun 2015, beban tertinggi kasus demam tifoid adalah pada subregional Asia Tenggara. Di Indonesia, demam tifoid harus mendapatkan perhatian yang serius karena bersifat endemis dan mengancam kesehatan masyarakat. Demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut usus halus yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella Typhi*. Dewasa ini sudah ditemukan galur *Salmonella Typhi* yang resisten terhadap beberapa antibiotika, sehingga untuk menghadapi tingginya kasus demam tifoid, obat herbal bisa dijadikan salah satu sumber alternatif pengobatan demam tifoid. Bahan dari alam yang mempunyai potensi antibakteri salah satunya adalah daun teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*). Senyawa antibakteri yang terkandung dalam daun teh hijau diantaranya adalah alkaloid, flavonoid, katekin, dan tanin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan efek antibakteri ekstrak etanol daun teh hijau terhadap bakteri *Salmonella Typhi*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi sumuran dengan empat kali pengulangan terhadap bakteri *Salmonella Typhi* menggunakan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% v/v dengan kontrol negatif berupa aquades, serta kontrol positif berupa *Ceftriaxone* 0,06%. Hasilnya terbentuk zona inhibisi pada semua konsentrasi tersebut. Analisis statistika menggunakan *One-way ANOVA* menunjukkan ada perbedaan diameter zona inhibisi pada berbagai konsentrasi ekstrak ($p=0,000$) dan hasil uji korelasi *Spearman* menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau, semakin besar pula diameter zona inhibisi yang terbentuk ($r=0,984$, $p=0,000$). Berdasarkan hasil penelitian, disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun teh hijau mempunyai efek antibakteri terhadap bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro* menggunakan metode sumuran.

Kata kunci: *Salmonella Typhi*, antibakteri, ekstrak etanol daun teh hijau, *Camellia sinensis var. assamica*

ABSTRACT

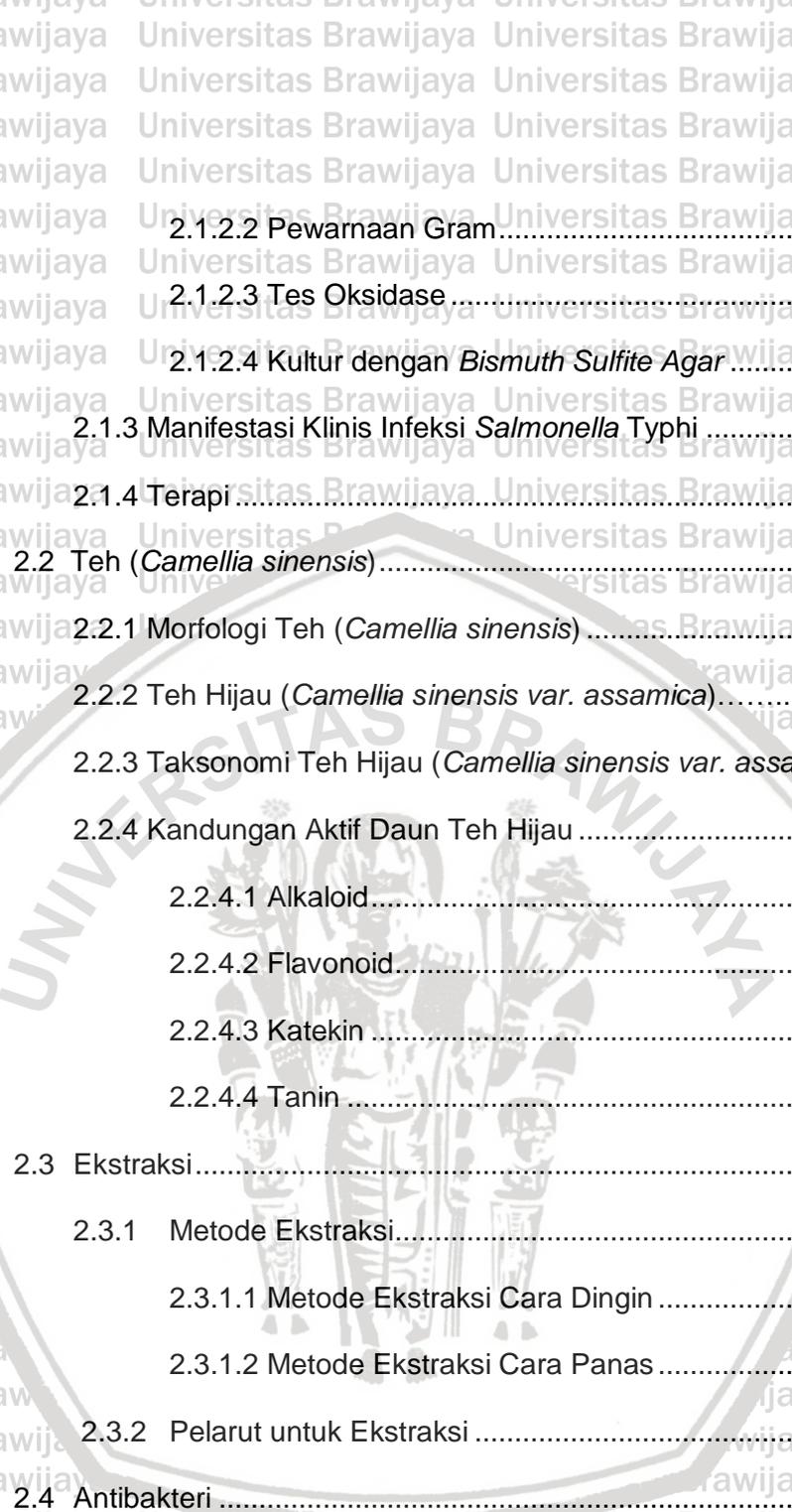
Teresa, Devina. 2018. Antibacterial Effect of Ethanol Extract of Green Tea Leaf (*Camellia Sinensis var. assamica*) Against *Salmonella* Typhi In Vitro Using Well Diffusion Method. Final Assignment. Medical Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisors: (1) Dr. dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt (2) dr. Dian Sukma, Sp.PK, M. Biomed.

WHO study 2015 stated that the highest burden of typhoid fever case is in the Southeast Asia subregion. In Indonesia, typhoid fever should get serious attention because it is endemic and threatens public health. Typhoid fever is an acute infection of the small intestine caused by *Salmonella* Typhi bacteria. Recently, *Salmonella* Typhi strain which resistant to existing antibiotics has developed, and so, herbal medicines can be used as an alternative source for treating typhoid fever. Natural ingredients that have antibacterial potential is green tea leaf (*Camellia sinensis var. assamica*). Antibacterial compounds contained in green tea leaf are alkaloids, flavonoids, catechins, and tannins. The purpose of this study is to prove the antibacterial effect of ethanol extract of green tea leaf on *Salmonella* Typhi bacteria. The method used in this study is well diffusion method with four repetitions using various extract concentrations. The concentration used are 5%, 10%, 15%, 20%, and 25% (v/v) with aquades as negative control and Ceftriaxone 0,06% as positive control. In the end of this research, inhibition zones were formed on each of those concentrations. The result of statistical analysis using one-way ANOVA shows that there is a significant difference between the inhibition zone diameter and the variant of extract concentration ($p=0,000$). The result of *Spearman* Correlation test shows a strong relationship between the administration of the extract and the inhibition zone diameter. The higher the concentration of ethanol extract of green tea leaf, the greater the diameter of inhibition zone formed ($r=0,984$, $p=0,000$). To conclude, the ethanol extract of green tea leaf has an antibacterial effect againts *Salmonella* Typhi *in vitro* using well diffusion method.

Keywords: *Salmonella* Typhi, antibacterial, ethanol extract of green tea leaf, *Camellia sinensis var. assamica*

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Gambar.....	xiv
Daftar Lampiran.....	xv
Daftar Singkatan.....	xvi
BAB 1. Pendahuluan.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.4.1 Manfaat Akademik.....	3
1.4.2 Manfaat Praktis.....	3
BAB 2. Tinjauan Pustaka.....	4
2.1 <i>Salmonella Typhi</i>	4
2.1.1 Taksonomi.....	4
2.1.2 Identifikasi Bakteri.....	4
2.1.2.1 Karakteristik Bakteri.....	4



2.1.2.2 Pewarnaan Gram.....	5
2.1.2.3 Tes Oksidase.....	6
2.1.2.4 Kultur dengan <i>Bismuth Sulfite Agar</i>	6
2.1.3 Manifestasi Klinis Infeksi <i>Salmonella Typhi</i>	7
2.1.4 Terapi.....	8
2.2 Teh (<i>Camellia sinensis</i>).....	8
2.2.1 Morfologi Teh (<i>Camellia sinensis</i>).....	9
2.2.2 Teh Hijau (<i>Camellia sinensis var. assamica</i>).....	10
2.2.3 Taksonomi Teh Hijau (<i>Camellia sinensis var. assamica</i>).....	10
2.2.4 Kandungan Aktif Daun Teh Hijau.....	11
2.2.4.1 Alkaloid.....	11
2.2.4.2 Flavonoid.....	11
2.2.4.3 Katekin.....	12
2.2.4.4 Tanin.....	12
2.3 Ekstraksi.....	12
2.3.1 Metode Ekstraksi.....	13
2.3.1.1 Metode Ekstraksi Cara Dingin.....	13
2.3.1.2 Metode Ekstraksi Cara Panas.....	13
2.3.2 Pelarut untuk Ekstraksi.....	14
2.4 Antibakteri.....	15
2.4.1 Mekanisme Kerja Antibakteri.....	15
2.4.1.1 Menghambat Metabolisme Sel Bakteri.....	15
2.4.1.2 Menghambat Sintesis Dinding Sel Bakteri.....	16
2.4.1.3 Mengganggu Keutuhan Membran Bakteri.....	16
2.4.1.4 Menghambat Sintesis Protein Sel Bakteri.....	16

2.4.1.5 Menghambat Sintesis Asam Nukleat Bakteri.....	17
2.5 Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM)	17
.....	17
2.6 Uji Kepekaan Antibakteri.....	17
2.6.1 Metode Dilusi.....	17
2.6.1.1 Dilusi Tabung.....	18
2.6.1.2 Dilusi Agar.....	18
2.6.2 Metode Difusi.....	19
2.6.2.1 Kirby-Bauer.....	19
2.6.2.2 Cara Sumuran.....	20
2.6.2.3 Cara <i>Pour Plate</i>	20
BAB 3. Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian.....	21
3.1 Kerangka Konsep.....	21
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep.....	22
3.3 Hipotesis Penelitian.....	22
BAB 4. Metode Penelitian.....	23
4.1 Rancangan Penelitian.....	23
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	23
4.2.1 Lokasi Penelitian.....	23
4.2.2 Waktu Penelitian.....	23
4.3 Sampel Penelitian.....	23
4.3.1 Perhitungan Besar Sampel.....	24
4.4 Variabel Penelitian.....	24
4.4.1 Variabel Bebas (Independen).....	24
4.4.2 Variabel Tergantung (Dependen).....	25

4.5	Definisi Operasional.....	25
4.6	Instrumen Penelitian.....	26
4.6.1	Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Daun Teh Hijau.....	26
4.6.2	Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri.....	26
4.6.3	Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri.....	26
4.6.3.1	Pewarnaan Gram.....	26
4.6.3.2	Bismuth Sulfite Agar.....	27
4.6.4	Alat dan Bahan untuk Difusi Sumuran.....	27
4.7	Prosedur Penelitian.....	27
4.7.1	Identifikasi bakteri <i>Salmonella</i> Typhi.....	27
4.7.1.1	Pewarnaan Gram.....	27
4.7.1.2	Bismuth Sulfite Agar (BSA).....	28
4.7.2	Persiapan Suspensi Bakteri Uji.....	29
4.7.3	Uji Sensitivitas Ekstrak Daun Teh sebagai Antibakteri.....	30
4.7.4	Skema Prosedur Penelitian.....	32
4.8	Analisis Data.....	33
BAB 5 Hasil Penelitian dan Analisis Data.....		35
5.1	Hasil Penelitian.....	35
5.1.1	Hasil Identifikasi Bakteri.....	35
5.1.2	Hasil Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau.....	36
5.1.3	Hasil Uji Eksplorasi.....	37
5.1.4	Hasil Uji Sensitivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran.....	37
5.2	Analisis Data.....	41
5.2.1	Uji Normalitas dan Homogenitas.....	41
5.2.2	Uji <i>One Way ANOVA</i> dan <i>Post-Hoc Tukey</i>	42

5.2.3 Uji Korelasi Spearman 42

5.2.4 Uji Regresi 43

BAB 6 Pembahasan 45

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian 45

6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran 47

6.3 Keterbatasan Penelitian 47

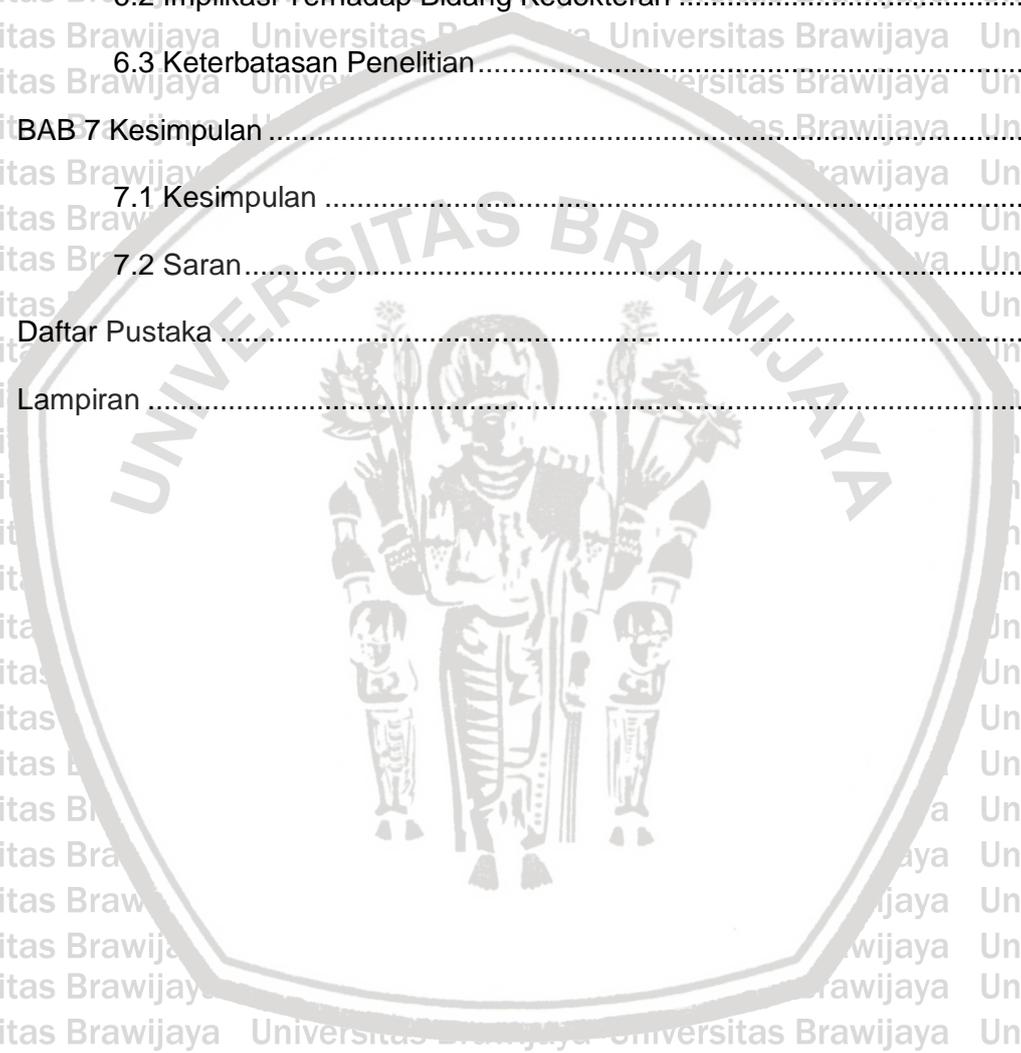
BAB 7 Kesimpulan 49

7.1 Kesimpulan 49

7.2 Saran 49

Daftar Pustaka 50

Lampiran 54



DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Hal
Tabel 4.1	Pembagian kelompok perlakuan	31
Tabel 5.1	Hasil pengukuran diameter zona inhibisi	40

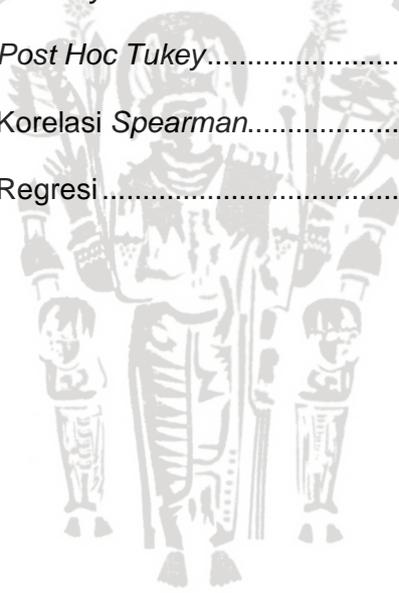


DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Hal
Gambar 2.1	Bakteri <i>Salmonella</i> Typhi secara mikroskopis.....	6
Gambar 2.2	Koloni bakteri <i>Salmonella</i> Typhi pada media BSA.....	7
Gambar 2.3	Tanaman <i>Camellia sinensis</i>	9
Gambar 2.4	Diagram alir pengolahan teh.....	10
Gambar 3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	21
Gambar 4.1	Alur penelitian metode difusi sumuran.....	32
Gambar 5.1	Pewarnaan Gram	35
Gambar 5.2	Gambaran <i>black jet colony</i> <i>Salmonella</i> Typhi dengan kilap logam pada medium BSA.....	36
Gambar 5.3	Ekstrak etanol daun teh hijau terlihat keruh di tabung (berwarna hijau pekat).....	37
Gambar 5.4	Zona inhibisi yang terbentuk pada difusi sumuran.....	38
Gambar 5.5	Rata-rata diameter zona inhibisi	41

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul	Hal
Lampiran 1	Zona Inhibisi pada Uji Eksplorasi.....	55
Lampiran 2	Alat dan Bahan Penelitian.....	56
Lampiran 3	Surat Keterangan Ekstrak.....	60
Lampiran 4	Uji Normalitas.....	61
Lampiran 5	Uji Homogenitas.....	62
Lampiran 6	Uji <i>Oneway ANOVA</i>	63
Lampiran 7	Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	64
Lampiran 8	Uji Korelasi <i>Spearman</i>	65
Lampiran 9	Uji Regresi.....	66



DAFTAR SINGKATAN

BSA : *Bismuth Sulfite Agar*

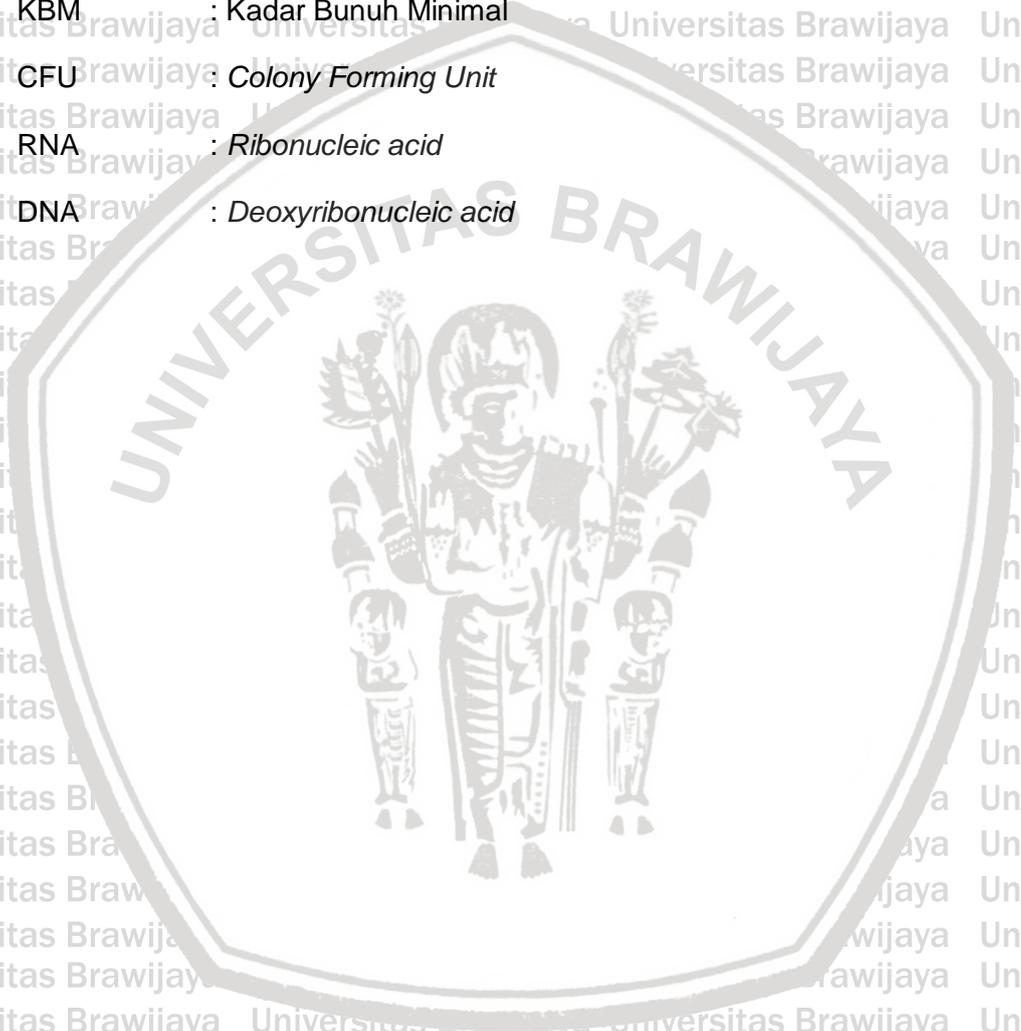
KHM : *Kadar Hambat Minimal*

KBM : *Kadar Bunuh Minimal*

CFU : *Colony Forming Unit*

RNA : *Ribonucleic acid*

DNA : *Deoxyribonucleic acid*



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Devina Teresa

NIM : 155070100111048

Program Studi : Sarjana Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 19 September 2018

Yang membuat pernyataan,



Devina Teresa

NIM. 155070100111048

ABSTRAK

Teresa, Devina. 2018. Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (*Camellia Sinensis var. assamica*) sebagai Antibakteri terhadap *Salmonella Typhi* secara *In Vitro* menggunakan Metode Sumuran. Tugas Akhir. Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt (2) dr. Dian Sukma, Sp.PK, M. Biomed.

Pada studi yang dilakukan WHO tahun 2015, beban tertinggi kasus demam tifoid adalah pada subregional Asia Tenggara. Di Indonesia, demam tifoid harus mendapatkan perhatian yang serius karena bersifat endemis dan mengancam kesehatan masyarakat. Demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut usus halus yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella Typhi*. Dewasa ini sudah ditemukan galur *Salmonella Typhi* yang resisten terhadap beberapa antibiotika, sehingga untuk menghadapi tingginya kasus demam tifoid, obat herbal bisa dijadikan salah satu sumber alternatif pengobatan demam tifoid. Bahan dari alam yang mempunyai potensi antibakteri salah satunya adalah daun teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*). Senyawa antibakteri yang terkandung dalam daun teh hijau diantaranya adalah alkaloid, flavonoid, katekin, dan tanin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan efek antibakteri ekstrak etanol daun teh hijau terhadap bakteri *Salmonella Typhi*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi sumuran dengan empat kali pengulangan terhadap bakteri *Salmonella Typhi* menggunakan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% v/v dengan kontrol negatif berupa aquades, serta kontrol positif berupa *Ceftriaxone* 0,06%. Hasilnya terbentuk zona inhibisi pada semua konsentrasi tersebut. Analisis statistika menggunakan *One-way ANOVA* menunjukkan ada perbedaan diameter zona inhibisi pada berbagai konsentrasi ekstrak ($p=0,000$) dan hasil uji korelasi *Spearman* menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau, semakin besar pula diameter zona inhibisi yang terbentuk ($r=0,984$, $p=0,000$). Berdasarkan hasil penelitian, disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun teh hijau mempunyai efek antibakteri terhadap bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro* menggunakan metode sumuran.

Kata kunci: *Salmonella Typhi*, antibakteri, ekstrak etanol daun teh hijau, *Camellia sinensis var. assamica*

ABSTRACT

Teresa, Devina. 2018. Antibacterial Effect of Ethanol Extract of Green Tea Leaf (*Camellia Sinensis* var. *assamica*) Against *Salmonella* Typhi In Vitro Using Well Diffusion Method. Final Assignment. Medical Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Supervisors: (1) Dr. dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt (2) dr. Dian Sukma, Sp.PK, M. Biomed.

WHO study 2015 stated that the highest burden of typhoid fever case is in the Southeast Asia subregion. In Indonesia, typhoid fever should get serious attention because it is endemic and threatens public health. Typhoid fever is an acute infection of the small intestine caused by *Salmonella* Typhi bacteria. Recently, *Salmonella* Typhi strain which resistant to existing antibiotics has developed, and so, herbal medicines can be used as an alternative source for treating typhoid fever. Natural ingredients that have antibacterial potential is green tea leaf (*Camellia sinensis* var. *assamica*). Antibacterial compounds contained in green tea leaf are alkaloids, flavonoids, catechins, and tannins. The purpose of this study is to prove the antibacterial effect of ethanol extract of green tea leaf on *Salmonella* Typhi bacteria. The method used in this study is well diffusion method with four repetitions using various extract concentrations. The concentration used are 5%, 10%, 15%, 20%, and 25% (v/v) with aquades as negative control and Ceftriaxone 0,06% as positive control. In the end of this research, inhibition zones were formed on each of those concentrations. The result of statistical analysis using one-way ANOVA shows that there is a significant difference between the inhibition zone diameter and the variant of extract concentration ($p=0,000$). The result of *Spearman* Correlation test shows a strong relationship between the administration of the extract and the inhibition zone diameter. The higher the concentration of ethanol extract of green tea leaf, the greater the diameter of inhibition zone formed ($r=0,984$, $p=0,000$). To conclude, the ethanol extract of green tea leaf has an antibacterial effect againts *Salmonella* Typhi *in vitro* using well diffusion method.

Keywords: *Salmonella* Typhi, antibacterial, ethanol extract of green tea leaf, *Camellia sinensis* var. *assamica*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut usus halus yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella Typhi*. Penyakit ini termasuk *foodborne disease*, yang berarti penularan penyakit ini adalah melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi. Menurut studi yang dilakukan oleh WHO mengenai beban masalah kesehatan global yang berfokus pada *foodborne disease*, dari sekitar 600 juta kasus *foodborne disease* yang disebabkan oleh 31 bahan berbahaya pada makanan, bakteri *Salmonella Typhi* menyebabkan 7.570.087 kasus dengan 52.000 kematian. Pada studi ini dilakukan pengamatan jumlah kasus pada negara-negara di dunia yang dibagi menjadi beberapa subregional, beban tertinggi kasus demam tifoid adalah pada subregional Asia Tenggara (WHO, 2015).

Di Indonesia, demam tifoid harus mendapatkan perhatian yang serius karena bersifat endemis dan mengancam kesehatan masyarakat. Berdasarkan profil kesehatan Indonesia tahun 2011, demam tifoid menempati urutan ke-3 dari 10 penyakit terbanyak pasien rawat inap di rumah sakit tahun 2010 yaitu sebanyak 41.081 kasus, yang meninggal 274 orang dengan *Case Fatality Rate* sebesar 0,67% (Kemenkes RI, 2012).

Dewasa ini sudah ditemukan galur *Salmonella Typhi* yang sensitivitasnya berkurang terhadap kloramfenikol, untuk itu antibiotik lain seperti seftriakson, ampisilin, kotrimoksazol atau sefotaksim dapat digunakan sebagai pilihan terapi demam tifoid (Hammad *et al.*, 2011).

Menghadapi tingginya kasus demam tifoid serta kemungkinan resistensi bakteri terhadap antibiotika yang sudah ada, obat herbal bisa dijadikan salah satu sumber alternatif untuk mengobati demam tifoid. Teh (*Camellia sinensis*) adalah salah satu tanaman herbal yang dikenal memiliki banyak manfaat. Kandungan aktif yang dapat ditemukan pada daun teh (*Camellia sinensis*) antara lain flavonoid, alkaloid, tanin, dan katekin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Klasifikasi tanaman teh terdiri atas teh hitam, teh putih, teh hijau, teh kuning, dan oolong. Teh hijau memiliki kandungan tanin dan katekin yang lebih tinggi dibandingkan jenis teh lainnya (Wang *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2006).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian tentang efek antibakteri dari ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) terhadap bakteri *Salmonella Typhi*. Efek antibakteri dapat diketahui dari berbagai cara, diantaranya menggunakan metode difusi sumuran (Jawetz *et al.*, 2007). Parameter yang diamati pada metode ini adalah diameter zona inhibisi.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol daun *Camellia sinensis var. assamica* memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Salmonella Typhi* yang ditunjukkan dari makin tinggi dosis yang diberikan maka makin lebar diameter zona inhibisi?

1.3 Tujuan Penelitian

Menganalisis adanya hubungan antara dosis ekstrak etanol daun *Camellia sinensis var. assamica* dengan diameter zona inhibisi terhadap bakteri *Salmonella Typhi*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat menambah ilmu pengetahuan mengenai efek *Camellia sinensis* var. *assamica* sebagai antibakteri, khususnya terhadap *Salmonella* Typhi.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat dijadikan sebagai rujukan bagi masyarakat dalam hal pengobatan demam tifoid yang murah dan mudah didapatkan.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Salmonella* Typhi

Salmonella Typhi merupakan bakteri penyebab demam tifoid yang merupakan salah satu penyakit endemis dan menimbulkan kerugian yang serius terutama di negara berkembang termasuk Indonesia. Pada dasarnya, *Salmonella* Typhi merupakan bakteri patogen dalam usus dimana infeksi terjadi akibat masuknya bakteri yang terkontaminasi kotoran atau tinja dari seorang penderita tifoid melalui mulut bersama makanan dan minuman dan kemudian berlanjut ke saluran pencernaan. Sebagian besar penderita tifoid merupakan sebagai agen pembawa (karier) dimana bakteri terletak pada usus (Jawetz *et al.*, 2007).

2.1.1 Taksonomi

Berikut adalah taksonomi *Salmonella* Typhi (Nugraha, 2012).

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Ordo	: Gamma Proteobacteria
Class	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella</i> Typhi

2.1.2 Identifikasi Bakteri

2.1.2.1 Karakteristik Bakteri

Salmonella merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang bergerak yang khas memfermentasikan glukosa dan manosa namun tidak memfermentasikan laktosa dan sukrosa. *Salmonella* menghasilkan H₂S. Bakteri ini memiliki diameter sekitar 0,7 - 1,5 mikron serta panjang sekitar 2 - 5 mikron (Jawetz *et al.*, 2007).

2.1.2.2 Pewarnaan Gram

Bakteri adalah mikroorganisme yang hanya dapat diamati dengan menggunakan mikroskop. Karena ukuran bakteri yang sangat kecil dan morfologinya yang tidak berwarna, diperlukan suatu pewarnaan agar bakteri tersebut dapat diidentifikasi. Salah satu cara pewarnaan pada bakteri yang telah dimatikan adalah pewarnaan diferensial. Pewarnaan diferensial yang digunakan salah satunya adalah pewarnaan Gram yang dapat membedakan bakteri berdasarkan struktur dinding selnya. Setelah dilakukan pewarnaan, warna akhir bakteri Gram positif akan tampak berwarna ungu dan bakteri Gram negatif akan tampak berwarna merah. Selanjutnya, bentuk bakteri dapat ditentukan dengan menggunakan mikroskop (Tortora *et al.*, 2004). *Salmonella* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang (Jawetz *et al.*, 2007).



Gambar 2.1 Bakteri *Salmonella Typhi* secara mikroskopis.

Pada perbesaran 1000x terlihat berbentuk batang bersifat Gram negatif

(berwarna merah) (Nugraha, 2012).

2.1.2.3 Tes Oksidase

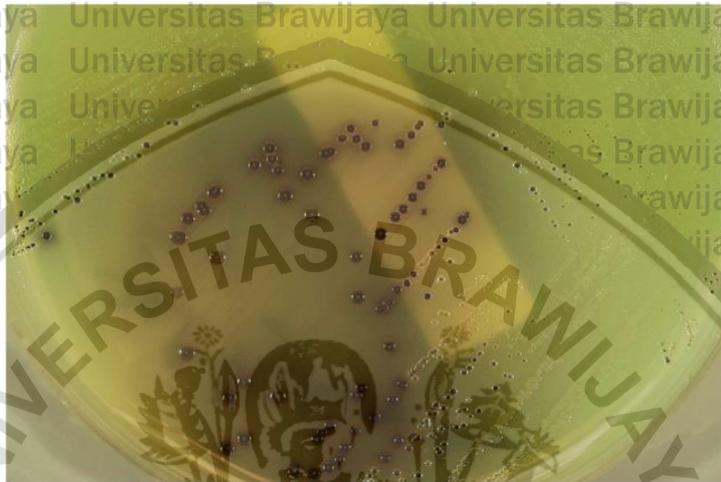
Tujuan uji oksidase adalah untuk mengetahui ada tidaknya enzim oksidase pada bakteri dengan menggunakan paper oksidase yang dapat dilihat perubahan warna yang terjadi pada paper oksidase. Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru violet maka uji oksidase dinyatakan positif dan menandakan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri non-enterik, sedangkan bila tidak terjadi perubahan warna maka uji oksidase dinyatakan negatif dan menandakan bakteri tersebut adalah bakteri enterik (Subekti, *et al.*, 2012).

2.1.2.4 Kultur dengan Bismuth Sulfite Agar

Bismuth Sulfite Agar merupakan modifikasi dari formula Wilson dan Blair.

Bismuth Sulfite Agar adalah media yang sangat selektif digunakan untuk

mengisolasi *Salmonella* spp., khususnya *Salmonella* Typhi, dari makanan dan spesimen klinis. Isolat *Salmonella* pada media BSA (Bismuth Sulfite Agar) menunjukkan adanya gambaran *black jet colony* dengan kilap logam (Nugraha, 2012).



Gambar 2.2 Koloni bakteri *Salmonella* Typhi pada media BSA (koloni kecil, berwarna hitam mengkilat) (Harvey and Price, 1974)

2.1.3 Manifestasi Klinis Infeksi *Salmonella* Typhi

Dosis infeksi penyebab penyakit pada manusia dalam menimbulkan infeksi klinik sekitar $10^3 - 10^8$ sel/mL. Infeksi yang terjadi pada manusia akibat bakteri *Salmonella* adalah demam enterik (demam tifoid), bakteremia, dan enterokolitis (Jawetz et al., 2007).

Salmonella menghasilkan endotoksin yang merupakan kompleks lipopolisakarida. Kompleks ini dianggap berperan penting pada patogenesis demam tifoid. Endotoksin bersifat pirogenik serta meningkatkan reaksi peradangan di tempat bakteri *Salmonella* berkembang biak. Infeksi terjadi ketika *Salmonella* melalui lambung dan mencapai usus dan invasi ke jaringan limfosit yang merupakan tempat predileksi untuk berkembang biak. Melalui saluran limfe

mesentrik bakteri masuk aliran darah sistemik (bakteremia) disebut sebagai fase inkubasi, yang terjadi pada hari ke 7 – 14. Setelah itu terjadi hiperpelasia kemudian nekrosis dan selanjutnya ulserasi hingga membentuk ulkus. Infeksi terjadi pada organ yang lain diantaranya tulang, usus, paru, ginjal, jantung, empedu dan organ lain. Bakteri dapat tinggal dalam empedu sehingga terdapat penderita karier akibat penyembuhan yang tidak sempurna (Kemenkes RI, 2006).

2.1.4 Terapi

Sampai saat ini masih diterapkan trilogi penatalaksanaan demam tifoid yaitu istirahat dan perawatan, diet dan terapi penunjang, serta pemberian antibiotik (Widodo, 2007). Kloramfenikol merupakan obat pilihan untuk demam tifoid di Indonesia karena efektivitasnya terhadap *Salmonella Typhi* masih tinggi di samping harga obat yang relatif murah. Sampai saat ini, kloramfenikol masih merupakan pilihan pertama pada terapi demam tifoid, jika sensitivitas *Salmonella Typhi* masih tinggi terhadap obat tersebut. Namun, dewasa ini sudah ditemukan galur *Salmonella Typhi* yang sensitivitasnya berkurang terhadap kloramfenikol, untuk itu antibiotik lain seperti seftriakson, ampicilin, kotrimoksazol atau sefotaksim dapat digunakan sebagai pilihan terapi demam tifoid (Hammad *et al.*, 2011).

2.2 Teh (*Camellia sinensis*)

Teh (*Camellia sinensis*) adalah salah satu tanaman herbal yang dikenal memiliki banyak manfaat. Teh sudah lama dikenal dan dikonsumsi oleh masyarakat sebagai minuman. Berdasarkan cara pengolahannya, teh dapat diklasifikasikan menjadi teh yang tidak terfermentasi (teh hijau atau *green tea*), teh yang terfermentasi (teh hitam atau *black tea*), teh yang semi terfermentasi (teh

oolong), dan teh yang hanya dikeringkan (teh putih atau *white tea*) (Engelhardt, 2010).

2.2.1 Morfologi Teh (*Camellia sinensis*)

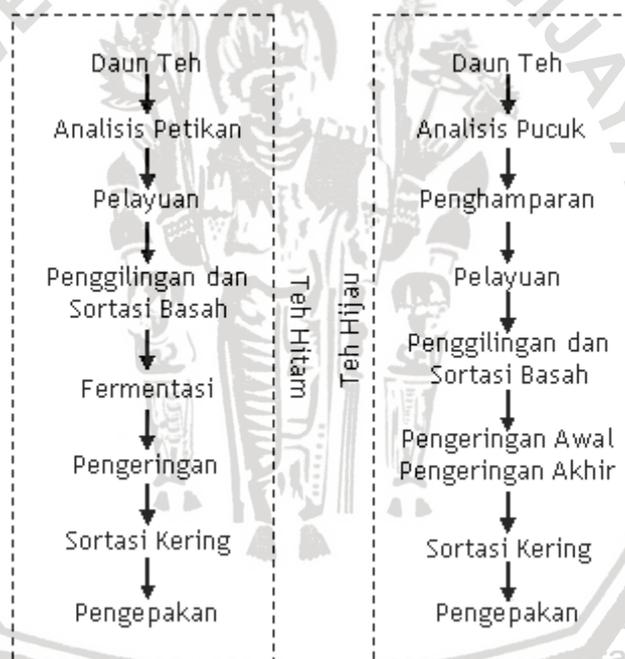
Daun teh berbau khas aromatik dengan rasa pahit. Daun teh memiliki ciri-ciri berupa helai-helai daun yang cukup tebal, kaku, berbentuk sudip memanjang, tepi daun bergerigi, dan agak tergulung ke bawah. Ukuran daun teh pada umumnya adalah kurang dari 5 cm. Daun teh bagian atas memiliki kenampakan mengkilat, sedangkan pada daun teh muda kenampakan bawahnya memiliki rambut. Pada daun teh yang telah tua, kenampakan bawah daun akan menjadi lebih licin. Daun teh (*Camellia sinensis*) memiliki dua varietas yang berbeda asal, yakni *var. sinensis* dari Cina dan *var. assamica* dari India. Varietas *sinensis* memiliki daun yang kecil dengan ujung yang menumpul. Varietas ini digunakan untuk memproduksi teh hitam. Varietas *assamica* memiliki daun yang lebih besar dengan ujung yang meruncing. Varietas ini digunakan untuk memproduksi teh hijau (Somantri, 2011).



Gambar 2.3 Tanaman *Camellia sinensis* (Hartoyo, 2003)

2.2.2 Teh Hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*)

Teh hijau adalah teh varian *Camellia sinensis* yang diperoleh tanpa melalui proses fermentasi dan dibuat dengan menginaktifkan enzim polifenol oksidase. Proses inaktivasi enzim ini terjadi melalui pemanasan sehingga oksidasi zat antioksidan di dalam daun teh dapat dicegah (Cabrera *et al.*, 2006). Proses pemanasan dapat dilakukan menggunakan udara kering (pemanggangan atau sangrai) atau pemanasan basah dengan uap (*steam*). Cara pemanggangan banyak ditemui pada produksi teh hijau di Cina, sedangkan penggunaan *steam* banyak ditemui pada produksi teh hijau di Jepang (*sencha*) (Wang *et al.*, 2000).



Gambar 2.4 Diagram alir pengolahan teh (Setyamidjaja, 2000)

2.2.3 Taksonomi Teh Hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*)

Taksonomi tanaman teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) adalah sebagai berikut (Nazaruddin, 1993).

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Ericales
Famili : Theaceae
Genus : Camellia
Spesies : *Camellia sinensis*
Varietas : var. *Assamica*

2.2.4 Kandungan Aktif Daun Teh Hijau

Daun teh hijau mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, katekin, dan tanin (Wang *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2006) yang dapat berperan sebagai antibakteri.

2.2.4.1 Alkaloid

Alkaloid menghambat pembentukan dinding sel bakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga bakteri tidak dapat bertahan hidup (Juliantina, 2008).

2.2.4.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa yang menghambat reaksi enzimatik (Sjahid, 2008). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan menghambat secara kompetitif terhadap sintesis metabolit esensial. (Juliantina, 2008).

2.2.4.3 Katekin

Beberapa senyawa katekin yang banyak ditemukan pada teh hijau adalah epigalokatekin dan epigalokatekin gallat. Kedua senyawa tersebut berperan dalam menghambat sintesis asam lemak bakteri. Bakteri membutuhkan asam lemak untuk membentuk membran selnya. Jika sintesis asam lemak dihambat, pembentukan membran sel bakteri dapat terganggu. Akibatnya, struktur dan fungsi membran sel bakteri menjadi rusak dan akhirnya sel bakteri akan lisis (Ikigai *et al.*, 1993). Katekin berperan dalam degradasi membran lipid bilayer sehingga sel menjadi lisis (Ikigai *et al.*, 1993).

2.2.4.4 Tanin

Tanin berperan sebagai antibakteri pada unit ribosom dan memiliki kemampuan menghambat ikatan peptida sehingga memperpendek rantai polipeptida. Hal ini akan menyebabkan metabolisme bakteri menjadi terganggu dan dapat menyebabkan lisis pada sel bakteri (Makkar, 1991).

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi adalah istilah dalam bidang farmasi yang artinya pemisahan bahan aktif baik pada tanaman maupun hewan dengan menggunakan pelarut selektif sesuai standart prosedur ekstraksi. Standardisasi proses ekstraksi bertujuan untuk memurnikan zat aktif dari zat lain dengan menggunakan pelarut tertentu, proses standardisasi juga sangat berpengaruh pada kualitas obat herbal (Cahyono, 2011).

2.3.1 Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut, dibedakan menjadi cara dingin dan cara panas. Cara dingin diantaranya adalah dengan maserasi dan perkolasi, sedangkan cara panas meliputi refluks, soxhletasi, digesti, infundasi dan dekoktasi (Depkes RIb, 2000).

2.3.1.1 Metode Ekstraksi Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi istilah aslinya adalah *macerare* (bahasa latin, artinya merendam) (Departemen Kesehatan RI, 1995). Maserasi adalah proses pengekstrakan dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (Depkes RIb, 2000).

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang selalu baru (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan (Depkes RIb, 2000).

2.3.1.2 Metode Ekstraksi Cara Panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Depkes RIb, 2000).

b. Soxhletasi

Soxhletasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik

(Depkes RIb, 2000).

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C (Depkes RIb, 2000).

d. Infundasi

Infundasi adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90°C selama 15 menit di penangas air, dapat berupa bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih (Depkes RIb, 2000).

e. Dekoktasi

Dekoktasi adalah infundasi pada waktu yang lebih lama (≥ 30 menit) dan temperatur sampai titik didih air (Depkes RIb, 2000).

2.3.2 Pelarut untuk Ekstraksi

Alkohol (metanol, etanol), aseton, dietil eter dan etil asetat adalah zat yang sering digunakan sebagai pelarut dalam proses ekstraksi, sebagai contoh ekstraksi asam fenolik yang sangat polar (benzoik, asam sinamik) disarankan mencampur pelarut dengan aquades. Untuk zat yang kurang polar seperti minyak, asam lemak dan klorofil yang sering digunakan adalah diklorometan, kloroform, hexan atau benzen. Penggunaan etanol 95% dalam proses ekstraksi akan meningkatkan jumlah kandungan zat yang terdapat didalam suatu ekstrak

tanaman (Michael, *et al.*, 2004; Mahmood, *et al.*, 2011). Faktor lain yang mempengaruhi proses ekstraksi diantaranya adalah keasaman (pH), suhu dan perbandingan simplisia dengan pelarut (Handa, *et al.*, 2007).

2.4 Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa kimia yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Bahan antibakteri yang baik adalah bahan yang dapat membunuh bakteri secara efektif tetapi tidak mengiritasi jaringan sekitarnya. Faktor-faktor yang berpengaruh pada aktivitas zat antibakteri adalah pH, suhu stabilitas senyawa, jumlah bakteri yang ada, lingkungan inkubasi dan aktivitas metabolisme bakteri. Aktivitas antibakteri dibedakan menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakterostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh bakteri patogen) dan bakterisidal (dapat membunuh bakteri patogen) (Bakhriansyah, 2008).

2.4.1 Mekanisme Kerja Antibakteri

Berikut ini adalah beberapa cara kerja antibakteri untuk menghambat maupun membunuh bakteri.

2.4.1.1 Menghambat Metabolisme Sel Bakteri

Aktivitas enzim seringkali dihambat oleh senyawa yang mempunyai struktur mirip dengan substrat asalnya. Senyawa ini bergabung dengan enzim sedemikian rupa sehingga dapat mencegah reaksi enzim dengan substrat dan reaksi-reaksi katalitik (Noorhamdani, *et al.*, 2016)

2.4.1.2 Menghambat Sintesis Dinding Sel Bakteri

Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antibakteri dapat menghambat sintesis dinding sel bakteri dengan cara menghambat pembentukan glikopeptida tersebut. Ketika aktivitas antibakteri menyebabkan tekanan osmotik yaitu tekanan dalam sel lebih tinggi daripada luar sel maka terjadilah kerusakan dinding sel yang akhirnya menyebabkan lisis pada bakteri (Setiabudy, 2009).

2.4.1.3 Mengganggu Keutuhan Membran Bakteri

Senyawa antibakteri dapat menyerang membran sitoplasma dan mempengaruhi integritasnya. Kerusakan pada membran sitoplasma mengakibatkan peningkatan permeabilitas dan kemudian terjadi kebocoran sel yang diikuti dengan keluarnya materi intraseluler seperti protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Setiabudy, 2009).

2.4.1.4 Menghambat Sintesis Protein Sel Bakteri

Sel bakteri memerlukan sintesis berbagai macam protein untuk kelangsungan hidupnya, sintesis ini berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Struktur ribosom sel prokariot adalah 70S, yang tersusun dari dua subunit, yaitu 30S dan 50S. (Noorhamdani, *et al.*, 2016) Senyawa antibakteri mampu menghambat sintesis protein bakteri dengan berikatan dengan komponen sel ribosom 30S dan/atau 50S yang menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada saat sintesis protein, sehingga akan terbentuk protein yang salah dan nonfungsional bagi bakteri (Setiabudy, 2009).

2.4.1.5 Menghambat Sintesis Asam Nukleat Bakteri

Senyawa antibakteri ini akan berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Senyawa antibakteri ini juga menghambat enzim DNA girase yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa cukup masuk ke dalam sel bakteri (Setiabudy, 2009).

2.5 Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM)

Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri disebut sebagai kadar hambat minimal (KHM) sedangkan kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh bakteri dikenal sebagai kadar bunuh minimal (KBM).

Antibakteri tertentu dapat meningkat efektivitasnya bila kadar antibakterinya ditingkatkan melebihi KHM (Setiabudy, 2009).

2.6 Uji Kepekaan Antibakteri

Penentuan kepekaan bakteri patogen terhadap antibakteri dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yakni dilusi atau difusi (Jawetz *et al.*, 2007).

2.6.1 Metode Dilusi

Metode Dilusi merupakan suatu metode uji antibakteri untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Terdapat dua cara yaitu kadar metode dilusi tabung dan dilusi agar.

2.6.1.1 Dilusi Tabung

Metode ini dilakukan dengan tabung reaksi, dengan cara diisi media cair dan beberapa sel bakteri dengan jumlah tertentu yang akan diuji. Selanjutnya obat yang sudah diencerkan dengan konsentrasi tertentu dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan selanjutnya diamati kekeruhan yang terjadi pada masing-masing tabung.

Yang dimaksud Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi terendah obat yang menunjukkan bahwa hasil biakan yang mulai terlihat jernih, yang berarti tidak ada pertumbuhan bakteri. Setelah biakan dari seluruh tabung yang jernih diinokulasi dengan media agar padat, kemudian dilakukan inkubasi kembali. Pada keesokan harinya dilakukan pengamatan untuk mengetahui adakah tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi bakteri pada uji ini adalah 10^6 CFU/ml. Untuk Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi minimal obat pada biakan media agar padat yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri (Tille, 2013).

2.6.1.2 Dilusi Agar

Metode ini dilakukan dengan metode dilusi agar (agar dilution test). Larutan antibakteri yang sudah diencerkan secara serial dicampurkan kedalam medium agar yang masih cair (tetapi tidak terlalu panas) kemudian agar dibiarkan memadat, selanjutnya diinokulasi dengan bakteri. Untuk metode ini, larutan antibakteri dibuat dengan kadar menurun dengan menggunakan teknik pengenceran secara seri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah selesai diinkubasi yang perlu dilakukan adalah mengamati dan menghitung pertumbuhan bakteri yang terdapat pada cawan (Tille, 2013).

2.6.2 Metode Difusi

Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi cakram.

Cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu obat ditempatkan pada medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji sebesar 10^8 CFU/ml pada permukaannya. Setelah diinkubasi, diameter zona inhibisi sekitar cakram dipergunakan untuk mengukur kekuatan hambatan obat terhadap organisme uji. Metode ini dipengaruhi beberapa faktor fisik dan kimia, selain faktor antara obat dan organisme (misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standardisasi faktor-faktor tersebut memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik.

Penggunaan cakram tunggal pada setiap antibakteri dengan standardisasi yang baik, bisa menentukan apakah bakteri peka atau resisten dengan cara membandingkan zona inhibisi standar bagi obat yang sama. Daerah hambatan sekitar cakram yang berisi sejumlah tertentu antibakteri tidak mencerminkan kepekaan pada obat dengan konsentrasi yang sama per millimeter medium, darah atau urin (Jawetz *et al.*, 2007).

Menurut Jawetz *et al.*, (2007), ada beberapa cara pada metode difusi ini, yaitu:

2.6.2.1 Kirby-Bauer

Cara Kirby-Bauer merupakan suatu metode uji sensitivitas bakteri yang dilakukan dengan membuat suspensi bakteri pada medium *Brain Heart Infusion* (BHI) cair dari koloni pertumbuhan bakteri 24 jam, selanjutnya disuspensikan dalam 0,5 ml BHI cair (diinkubasi 4-8 jam pada suhu 37°C). Hasil inkubasi bakteri diencerkan sampai sesuai dengan standar konsentrasi bakteri. Bakteri diuji

sensitivitasnya dengan meratakan suspensi bakteri tersebut pada permukaan medium agar. Cakram antibakteri diletakkan di atas medium tersebut dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 19-24 jam (Jawetz *et al.*, 2007).

2.6.2.2 Cara Sumuran

Suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diratakan pada medium agar cair Mueller Hinton, diamkan beberapa saat hingga mengeras, kemudian agar tersebut dibuat sumuran dengan diameter 5 mm. Larutan antibakteri yang digunakan diteteskan sebesar 50 μ L ke dalam sumuran. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan kemudian dibaca hasilnya. (Jawetz *et al.*, 2007).

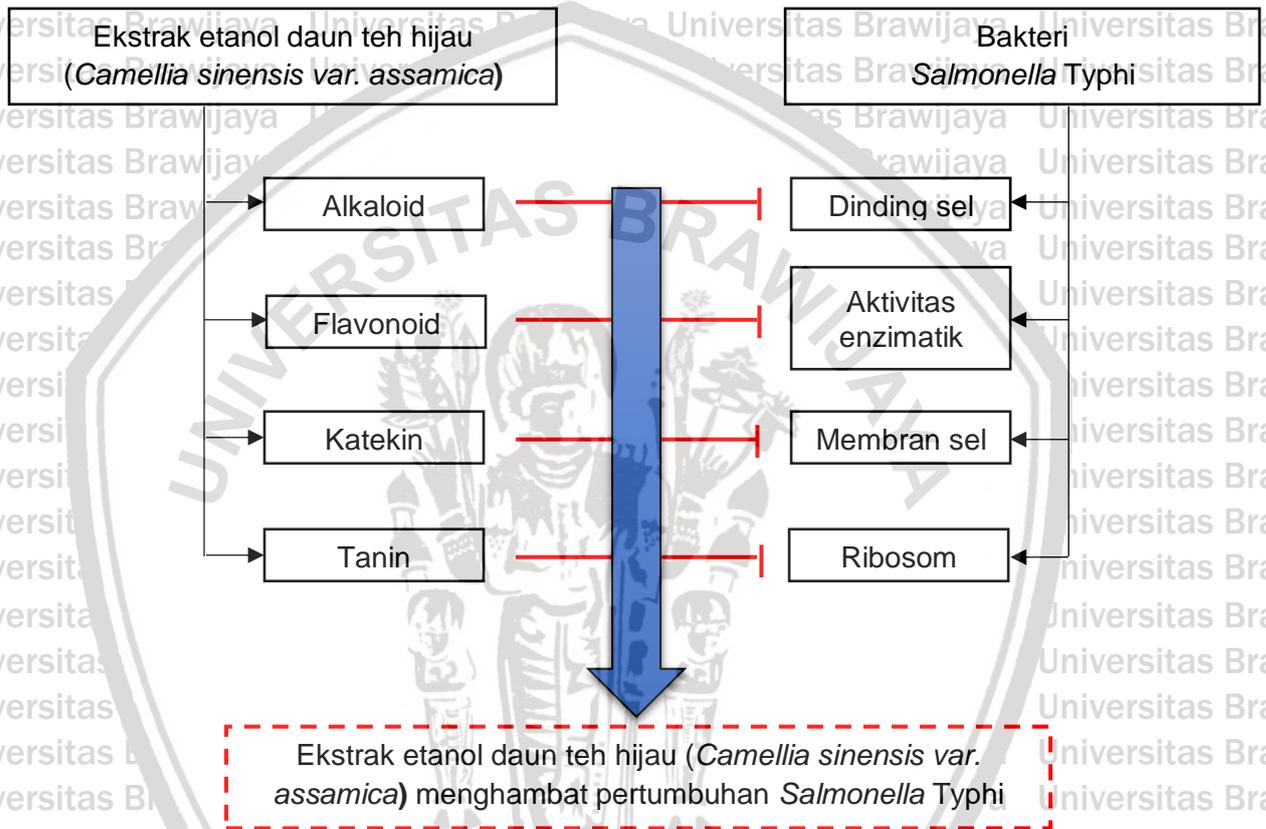
2.6.2.3 Cara Pour Plate

Setelah dibuat suspensi bakteri dengan larutan BHI sampai konsentrasi standar, lalu diambil satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 4 ml agar base 1,5% dengan suhu 50°C. Suspensi bakteri tersebut dibuat homogen dan dituang pada medium agar Mueller Hinton. Setelah beku, kemudian dipasang cakram antibakteri (diinkubasi 15-20 jam pada suhu 37°C) dibaca dan disesuaikan dengan standar masing-masing antibakteri (Jawetz *et al.*, 2007).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

→ : komponen

— : merusak

- - - : target penelitian

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Daun teh hijau mengandung zat aktif berupa alkaloid, flavonoid, katekin, dan tanin

(senyawa non-nutrisi) yang digunakan oleh tanaman untuk melindungi diri dari serangan bakteri, jamur dan hama lainnya. Mekanisme antibakteri alkaloid

berkaitan dengan kemampuannya menghambat pembentukan dinding sel bakteri sehingga menyebabkan lisis pada sel bakteri. Flavonoid merupakan senyawa

yang menghambat reaksi enzimatik. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan menghambat secara kompetitif terhadap sintesis

metabolit esensial. Katekin berperan dalam menghambat sintesis asam lemak bakteri. Bakteri membutuhkan asam lemak untuk membentuk membran selnya.

Jika sintesis asam lemak dihambat, pembentukan membran sel bakteri dapat terganggu. Akibatnya, permeabilitas sel bakteri menjadi rusak dan akhirnya sel

bakteri akan lisis. Sedangkan tanin berperan sebagai antibakteri pada unit ribosom 50S dan memiliki kemampuan menghambat ikatan peptida sehingga

memperpendek rantai polipeptida. Hal ini akan menyebabkan metabolisme bakteri menjadi terganggu dan dapat menyebabkan lisis pada sel bakteri. Dengan

demikian, dapat dihipotesiskan bahwa ekstrak etanol daun teh hijau dengan kandungan-kandungan zat aktifnya dapat menghambat pertumbuhan bakteri

Salmonella Typhi.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) memiliki efek antibakteri terhadap *Salmonella Typhi*, yang ditunjukkan dengan makin tinggi

dosis ekstrak yang diberikan, diameter zona inhibisi akan semakin lebar.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian eksperimental dengan *Post Test Control Group Design*. Metode yang digunakan adalah metode difusi sumuran, dengan parameter yang diamati adalah diameter zona inhibisi dari berbagai konsentrasi efek ekstrak etanol daun teh hijau yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.2.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2018.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini berupa bakteri *Salmonella* Typhi yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang diperoleh (diisolasi) sesuai dengan prosedur standar. Sampel terdiri dari 3 isolat darah dan 1 isolat pus.

4.3.1 Perhitungan Besar Sampel

Jumlah pengulangan pada penelitian ini untuk masing-masing perlakuan dapat dihitung dengan rumus Federer, yaitu $p(n - 1) \geq 15$ dengan n = jumlah pengulangan tiap perlakuan; p = jumlah perlakuan (Federer, 2014). Karena terdapat 7 perlakuan yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% dengan kontrol negatif berupa aquades, serta kontrol positif berupa *Ceftriaxone* 0,06%, maka perhitungan rumusnya adalah:

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,2 \sim 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, didapatkan $n = 3,2$ yang kemudian dibulatkan menjadi 4, sehingga jumlah pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini sebanyak 4 sampel bakteri *Salmonella* Typhi dengan jumlah sel bakteri masing-masing 10^8 CFU/mL.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% (v/v). Pemilihan dosis berdasarkan dari hasil uji eksplorasi yang dilakukan sebelum penelitian.

4.4.2 Variabel Tergantung (Dependen)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

4.5 Definisi Operasional

a. Daun teh hijau

Ekstrak *Camellia sinensis* var. *assamica* adalah hasil ekstraksi daun teh hijau dengan pelarut etanol. Teh hijau yang digunakan adalah tanaman teh hijau yang didapat dari Materia Medika Batu. Hasil akhir dari proses ekstraksi adalah ekstrak daun teh hijau yang siap dipergunakan dalam penelitian ini. Apabila tidak sedang digunakan dalam jangka waktu cukup lama, maka ekstrak daun teh hijau dapat disimpan di dalam suatu botol plastik tertutup dan disimpan dalam *freezer*. Metode yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak daun teh hijau adalah maserasi dengan pelarut etanol 96% dan evaporasi (untuk menguapkan pelarut).

b. *Salmonella* Typhi

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Salmonella* Typhi. Sampel terdiri dari 3 isolat darah (isolat I, II, dan III) dan 1 isolat pus (isolat IV).

c. *Ceftriaxone* 0,06%

Merupakan kontrol positif pada penelitian ini, dimana konsentrasi adalah sama dengan *Ceftriaxone disk*.

d. Zona Inhibisi

Zona inhibisi adalah zona steril yang terbentuk di sekitar lubang sumuran yang menunjukkan bahwa bahan ekstrak dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Diameter zona inhibisi diukur dalam satuan milimeter (mm).

4.6 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini mencakup alat dan bahan untuk pembuatan ekstrak daun teh hijau, kultur bakteri, pewarnaan Gram, *disc diffusion*, dan difusi sumuran.

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Daun Teh Hijau

Alat yang digunakan adalah evaporator, labu evaporator, timbangan, gelas erlenmeyer, *waterbath*, dan blender. Sedangkan bahan yang dipakai untuk membuat ekstrak adalah daun teh hijau, etanol 96%, dan aquades.

4.6.2 Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri

Alat yang dipakai untuk kultur bakteri adalah tabung reaksi, ose, spektrofotometer, inkubator, lampu spiritus (bunsen), korek api, dan label. Sedangkan bahan yang digunakan meliputi koloni bakteri *Salmonella Typhi* dan medium *Nutrient Agar Plate* (NAP).

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

4.6.3.1 Pewarnaan Gram

Alat yang digunakan untuk pewarnaan Gram adalah *object glass*, kaca penutup, lampu spiritus (bunsen), korek api, ose, mikroskop, dan minyak emersi.

Sedangkan bahan yang dipakai adalah suspensi bakteri *Salmonella Typhi* dari

Nutrient Broth, aquades steril, serta bahan-bahan pewarnaan Gram seperti kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin.

4.6.3.2 Bismuth Sulfite Agar

Alat yang dipakai untuk identifikasi bakteri dengan medium *Bismuth Sulfite Agar (BSA)* adalah tabung reaksi, ose, spektrofotometer, inkubator, lampu spiritus (bunsen), korek api, dan label. Sedangkan bahan yang digunakan meliputi koloni bakteri *Salmonella Typhi* dan medium *Bismuth Sulfite Agar (BSA)*.

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Difusi Sumuran

Alat yang digunakan adalah cawan petri, pelubang sumuran, mikropipet, inkubator, bunsen burner, korek api, dan penggaris. Bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol daun teh hijau, suspensi bakteri *Salmonella Typhi* 10^8 CFU/ml, aquades, dan agar Mueller Hinton.

4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak daun teh hijau, identifikasi bakteri uji *Salmonella Typhi*, dan persiapan suspensi bakteri uji *Salmonella Typhi* sebagai antibakteri dengan difusi sumuran.

4.7.1 Identifikasi bakteri *Salmonella Typhi*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk melihat bentuk bakteri serta mengetahui apakah bakteri uji termasuk dalam Gram positif atau negatif. Prosedur pewarnaan

Gram adalah:

- Dibuat sediaan dengan cara mengambil 1 ose bakteri uji dari kultur dan diteteskan ke kaca obyek.
- Sediaan kaca objek dikeringkan di udara kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan kaca objek di atas api bunsen.
- Sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit.
- Sisa bahan pewarna dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi larutan lugol sebagai *mordant*, dibiarkan selama 1 menit.
- Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi alkohol 96% sebagai peluntur selama 5-10 detik.
- Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik.
- Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100x.
- Bakteri *Salmonella* Typhi berbentuk batang dan bersifat Gram negatif (berwarna merah).

4.7.2.2 Bismuth Sulfite Agar (BSA)

Streaking pada media BSA dilakukan untuk melihat bentuk koloni bakteri secara spesifik. Prosedur streaking bakteri suspensi uji pada media BSA adalah sebagai berikut:

- Membagi cawan petri menjadi 4 bagian.

- Diambil isolat bakteri menggunakan ose steril, kemudian menggoreskan ose tersebut pada cawan petri berisi media steril. Goresan dapat dilakukan 3-4 kali membentuk garis horizontal disatu cawan petri.
- Ose disterilkan kembali dengan api bunsen.
- Setelah kering, ose tersebut digunakan untuk menggores goresan sebelumnya pada sisi cawan ke dua. Langkah ini dilanjutkan hingga keempat sisi cawan tergores.
- Cawan yang menampung sediaan ditutup dan diinkubasi pada suhu 10-30°C selama 48 jam.
- Dilakukan pengamatan bentuk dan warna koloni bakteri, disebut bakteri *Salmonella* Typhi apabila terlihat koloni berwarna coklat-kehitaman (*black jet colony*) dengan kilapan logam (*metallic sheen*).

4.7.2 Persiapan Suspensi Bakteri Uji

Perbenihan cair bakteri *Salmonella* Typhi dari NAP dinilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Dari nilai absorbansi tersebut, dapat diperkirakan jumlah bakteri pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 ekuivalen dengan jumlah bakteri sebesar 10^8 CFU/mL (Irmawartini, *et al.*, 2017). Dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume suspensi bakteri uji yang akan ditambah pengencer

N_2 = Optical density (0,1 = setara dengan 10^8 CFU/mL)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)

N_1 sama dengan nilai absorbansi yang didapat sedangkan N_2 adalah absorbansi 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/mL. V adalah

volume suspensi bakteri uji *Salmonella* Typhi. Dari rumus tersebut, akan diperoleh volume (mL) suspensi bakteri uji yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL sebanyak 10 mL.

4.7.3 Uji Sensitivitas Ekstrak Daun Teh Hijau Sebagai Antibakteri

Uji sensitivitas ini dilakukan dengan metode difusi sumuran menggunakan 5 macam konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% dengan kontrol negatif berupa aquades, serta kontrol positif berupa *Ceftriaxone* 0,06%. Prosedurnya adalah:

- Menyiapkan cawan petri sebanyak empat buah yang berisi masing-masing isolat bakteri *Salmonella* Typhi yang berbeda.
- Masing-masing suspensi bakteri *Salmonella* Typhi dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diratakan pada medium agar cair Mueller Hinton, kemudian agar tersebut dibuat sumuran dengan diameter 5 mm.
- Cawan petri digoyang-goyangkan sehingga suspensi bakteri *Salmonella* Typhi dengan agar Mueller Hinton tercampur dengan rata, lalu diamkan beberapa saat hingga mengeras.
- Lubang sumuran dibuat di tiap cawan petri pada ketujuh sisi, dengan menggunakan pelubang sumuran berdiameter 5 mm.
- Lubang sumuran pertama diisi 50 μ L aquades sebagai kontrol negatif, lubang sumuran kedua sampai keenam berisi 50 μ L larutan ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% yang didapat setelah melakukan uji eksplorasi. Lubang sumuran ketujuh (yang letaknya di tengah) berisi 50 μ L *Ceftriaxone* sebagai kontrol positif.

- Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.

Mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan penggaris dalam satuan millimeter. Pengukuran diameter zona

inhibisi dilakukan dalam arah vertikal dan horizontal lalu dihitung rata-ratanya.

Diameter diukur dari batas terluar dari zona inhibisi dari satu sisi ke sisi lainnya.

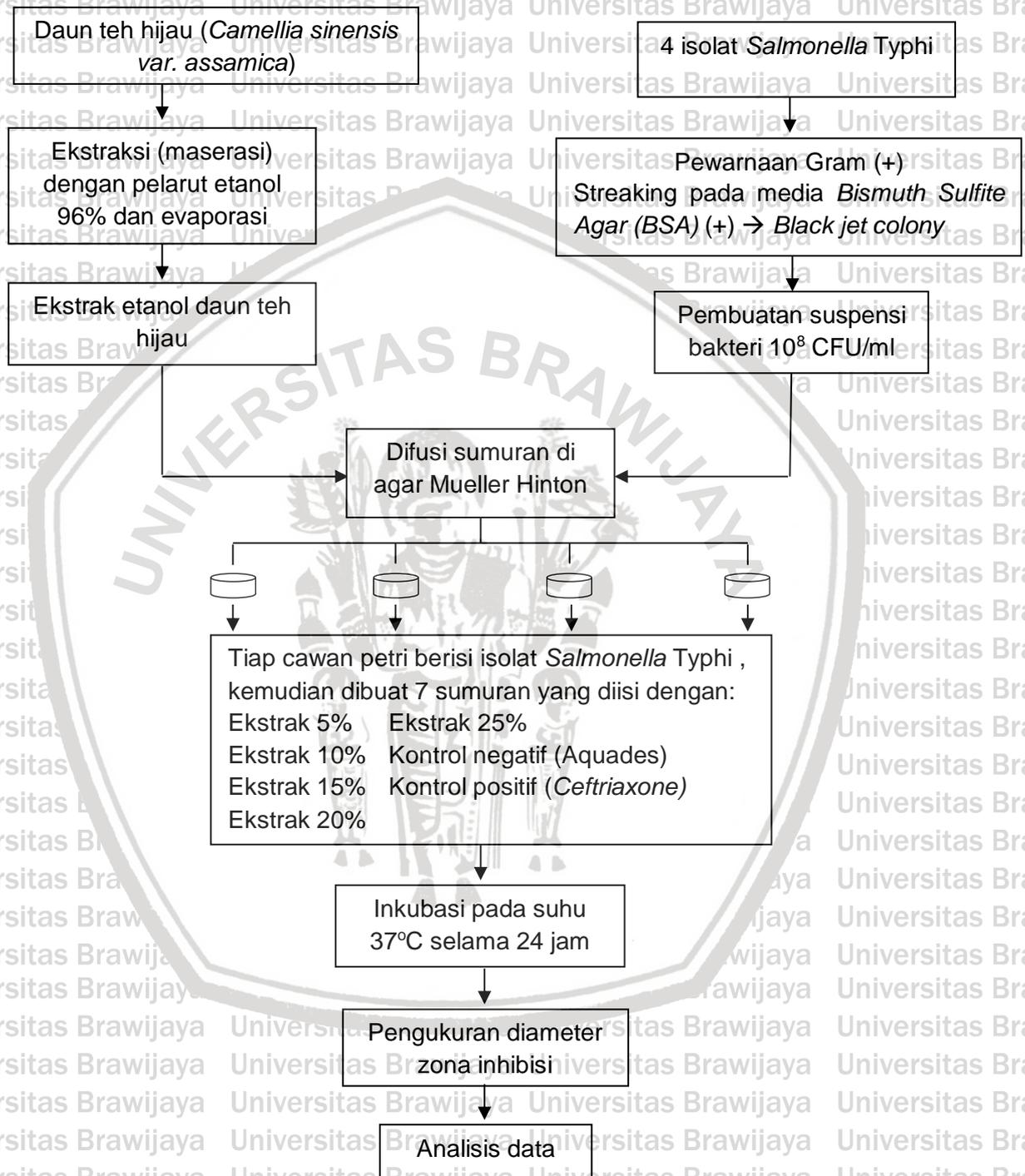
Tabel 4.1 Pembagian kelompok perlakuan

Perlakuan	Konsentrasi (% v/v)
Kontrol Negatif	0 % (aquades)
P1	5%
P2	10%
P3	15%
P4	20%
P5	25%
Kontrol Positif	Ceftriaxone 0,06%

Konsentrasi diatas didapatkan dari uji eksplorasi yang terlebih dahulu dilakukan. Uji eksplorasi dilakukan dengan meneteskan ekstrak etanol daun teh hijau sebesar 10 µL dengan konsentrasi 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% di atas agar yang sudah dilakukan *streaking* bakteri (lihat **Lampiran 1**).

Hasil uji eksplorasi akan dibahas pada bab 5.

4.7.4 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Alur penelitian metode difusi sumuran

4.8 Analisis Data

Penelitian memiliki satu faktor yang ingin diketahui yaitu zona inhibisi bakteri *Salmonella* Typhi terhadap perlakuan pemberian ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*). Uji statistik yang digunakan adalah uji beda parametrik Kruskal Wallis dengan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) 15.0.

Adapun langkah-langkah pengujian sebagai berikut.

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (non parametrik).
2. Uji komparasi dilakukan dengan cara *One-Way ANOVA* > 2 kelompok untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol daun teh hijau terhadap pertumbuhan koloni *Salmonella* Typhi, dengan syarat:
 - a. Sebaran data harus normal
 - b. Varian data harus sama (homogen)

Namun jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal, maka digunakan metode *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan ukuran zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran pada setiap perlakuan.

3. Uji *Post Hoc Tukey* dilakukan untuk mengetahui pasangan kelompok perlakuan yang memberikan perbedaan yang signifikan.
4. Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel dependen dan variabel independen. Jika data parametrik maka digunakan Uji Korelasi *Pearson*, sedangkan data non parametrik akan diuji dengan Uji Korelasi *Spearman*. Pada penelitian ini digunakan Uji Korelasi *Spearman*. Uji korelasi

dilakukan untuk mengetahui hubungan konsentrasi pemberian ekstrak etanol daun teh hijau dan dengan lebar diameter zona inhibisi.



BAB 5

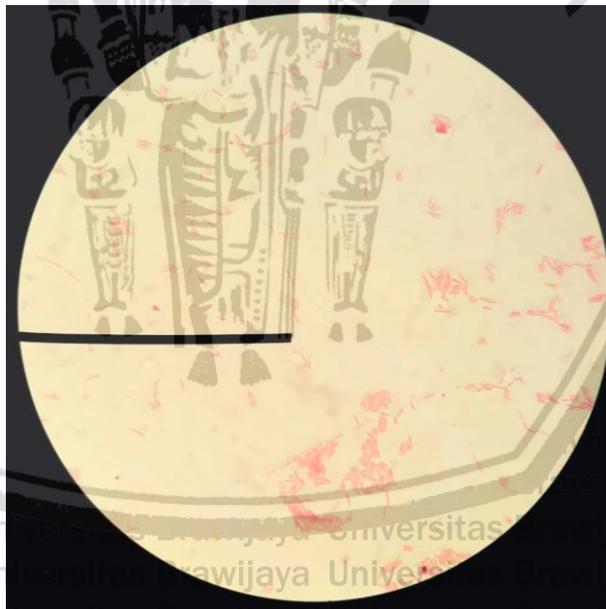
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

Penelitian ini menggunakan sampel berupa empat isolat *Salmonella* Typhi yang diperoleh dari satu isolat pus dan tiga isolat darah dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Uji identifikasinya berupa pewarnaan Gram dan kultur bakteri dengan medium BSA (*Bismuth Sulfite Agar*).

Hasil dari pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 100x didapatkan gambaran bakteri dengan bentuk batang berwarna merah muda, yang merupakan ciri dari bakteri Gram negatif.



Gambar 5.1 Pewarnaan Gram.

Didapatkan gambaran bentuk batang berwarna merah (bakteri Gram negatif) pada pengamatan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x.

Kultur bakteri dengan medium BSA (*Bismuth Sulfite Agar*) didapatkan hasil gambaran *black jet colony* dengan kilap logam.



Gambar 5.2 Gambaran *black jet colony Salmonella Typhi* dengan kilap logam pada medium BSA.

Keterangan:

Isolat 1: Darah 12045

Isolat 2: Darah Lab 1

Isolat 3: Darah Lab 2

Isolat 4: Pus 7709

5.1.2 Hasil Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau

Didapatkan ekstrak etanol daun teh hijau berbentuk pasta sejumlah $\pm 200\text{mL}$. Ekstrak etanol daun teh hijau didapatkan dengan menggunakan metode maserasi berwarna hijau pekat, sehingga tidak cocok apabila digunakan untuk uji antibakteri dengan metode dilusi tabung. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan metode difusi sumuran.



Gambar 5.3 Ekstrak etanol daun teh hijau terlihat keruh di tabung

(berwarna hijau pekat)

5.1.3 Hasil Uji Eksplorasi

Uji eksplorasi dilakukan dengan meneteskan ekstrak etanol daun teh hijau sebesar 10 μL dengan konsentrasi 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% di atas agar yang sudah dilakukan *streaking* bakteri (lihat **Lampiran 1**).

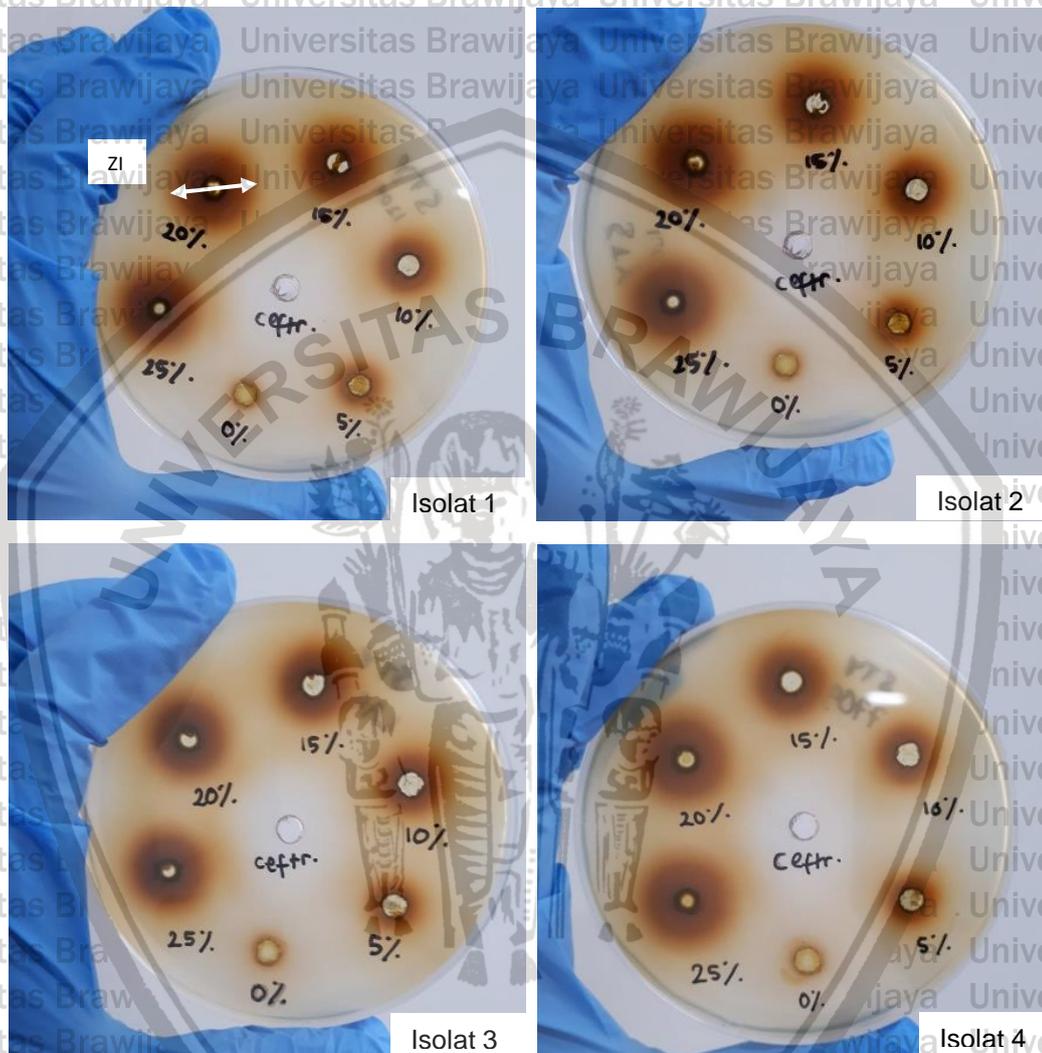
Berdasarkan uji eksplorasi yang dilakukan, zona inhibisi mulai terbentuk jelas di sekitar tetesan pada konsentrasi 3,125%.

Pengujian potensi antimikroba terhadap bakteri *Salmonella* Typhi melalui difusi sumuran digunakan 5 macam konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% dengan kontrol negatif berupa aquades, serta kontrol positif berupa *Ceftriaxone* 0,06%.

5.1.4 Hasil Uji Sensitivitas Antibakteri dengan Metode Sumuran

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi berbeda ekstrak etanol daun teh hijau, yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, 25% serta diberi perlakuan menggunakan kontrol negatif berupa aquades dan kontrol positif berupa *Ceftriaxone* 0,06%. Pengamatan efek antibakteri ekstrak etanol daun teh hijau

terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* didapatkan dengan uji difusi sumuran. Uji dengan mengamati besar diameter zona inhibisi yang terbentuk disekitar lubang sumuran dan diamati menggunakan penggaris dalam satuan milimeter (mm).



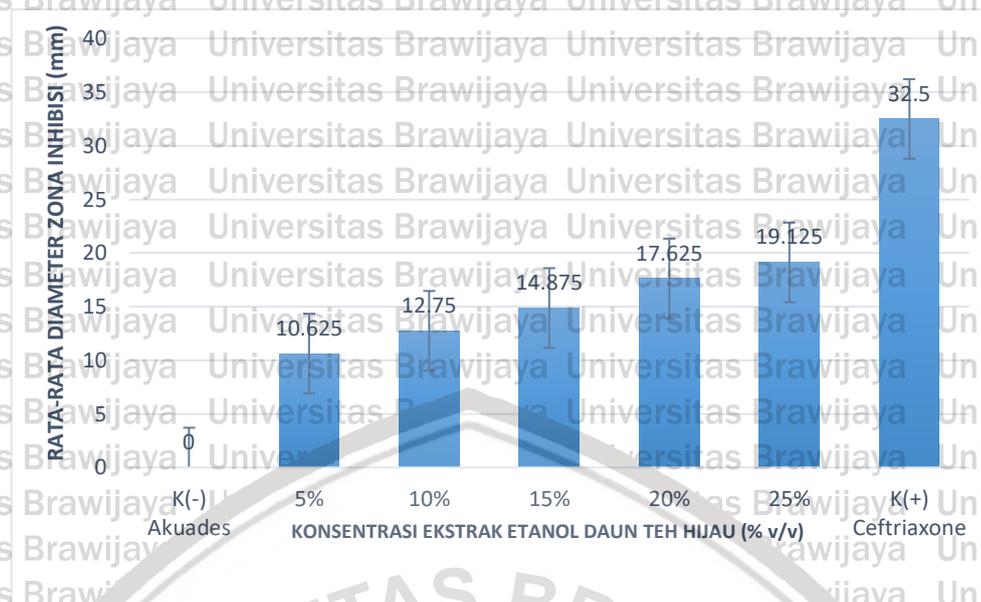
Gambar 5.4 Zona inhibisi yang terbentuk pada difusi sumuran.

Hasil pengamatan pada difusi sumuran dengan konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau 5%, 10%, 15%, 20%, 25% serta kontrol negatif dan kontrol positif terhadap *Salmonella Typhi*.

Hasil pengamatan pada cawan petri setelah diinkubasi didalam suhu ruang selama 18-24 jam didapatkan bahwa zona inhibisi dapat terlihat pada konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% , serta pada kontrol positif. Diameter zona inhibisi yang terbesar diperoleh dari pengamatan terhadap kontrol positif. Sedangkan dengan perlakuan ekstrak etanol daun teh hijau mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau maka semakin besar pula diameter zona inhibisi yang terbentuk dan terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* karena pemberian ekstrak etanol daun teh hijau. Dari hasil uji difusi sumuran, didapatkan diameter zona inhibisi ekstrak etanol daun teh hijau terhadap bakteri *Salmonella Typhi* yang diukur menggunakan penggaris. Hasil pengukuran diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dapat dilihat pada Tabel 5.1, sedangkan grafiknya dapat dilihat pada Gambar 5.5 berikut.

Tabel 5.1 Hasil pengukuran diameter zona inhibisi. Diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran (mm) pada keempat isolat bakteri *Salmonella Typhi* pada pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau.

Konsentrasi ekstrak (% v/v)	Pengulangan				Rata-rata diameter \pm SD (mm)
	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	
K(-)	0	0	0	0	0
5%	10	11	10,5	11	10,625 \pm 0,47
10%	12,5	12,5	12,5	13,5	12,75 \pm 0,50
15%	14	15	15	15,5	14,875 \pm 0,62
20%	17	17	18,5	18	17,625 \pm 0,75
25%	18	18,5	19,5	20,5	19,125 \pm 1,10
K(+)	31,5	32,5	33	33	32,5 \pm 0,70



Gambar 5.5 Rata-rata diameter zona inhibisi.

Zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran setelah perlakuan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau terhadap 4 isolat bakteri *Salmonella Typhi* yang berbeda, dengan perbandingan kontrol negatif (aquades) dan positif (*Ceftriaxone*).

5.2 Analisis Data

5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas Varian

Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan *Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui apakah data sampel penelitian berasal dari populasi yang berdistribusi normal. Dari uji normalitas yang dilakukan, didapat nilai signifikansi sebesar 0,096 ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal (parametrik). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian dengan tujuan untuk mengetahui bahwa dua kelompok atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama. Hasil uji homogenitas varian dengan *Levene Test Homogeneity of Variance* menunjukkan nilai signifikansi 0,167

($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa variasi tiap sampel sama atau homogen. Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 4 dan 5**.

5.2.2 Uji *One Way ANOVA* dan *Post Hoc Tukey*

Karena sampel berdistribusi normal dan memiliki variasi homogen, dapat dilakukan uji statistik parametrik yaitu *One-way ANOVA Test* untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata diameter zona inhibisi yang disebabkan adanya perlakuan berupa pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau terhadap bakteri *Salmonella Typhi*. Pada *One-way ANOVA Test* didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.000 ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh signifikan dari efek perubahan konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau terhadap bakteri *Salmonella Typhi* jika dilihat dari zona inhibisi. Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 6**.

Pada uji *Post Hoc Test* didapatkan perbedaan signifikan pada semua konsentrasi dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) kecuali pada hubungan antara konsentrasi 20% dan 25% yang tidak berbeda signifikan karena memiliki nilai signifikansi 0,061 ($p > 0,05$). Pada kontrol positif, *Ceftriaxone* 0,06%, juga didapatkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$). Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 7**.

5.2.3 Uji Korelasi *Spearman*

Uji korelasi *Spearman* dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak daun teh hijau dengan beberapa konsentrasi terhadap zona inhibisi yang diamati dengan mengukur diameter di sekitar lubang sumuran. Hasil uji korelasi *Spearman* diperoleh angka signifikansi yaitu 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi

ekstrak etanol daun teh hijau dengan diameter zona inhibisi. Serta didapatkan koefisien korelasi antara pemberian ekstrak etanol daun teh hijau terhadap zona inhibisi sebesar 0,984. Dari hasil angka yang didapat merupakan bilangan positif, maka hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau, semakin besar pula diameter zona inhibisi yang terbentuk dan sebaliknya.

Nilai 0,984 mendekati 1,000 sehingga dapat diinterpretasikan bahwa hubungan korelasi ini cukup kuat. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, akan semakin lebar diameter zona inhibisi. Hasil lebih rinci terdapat pada

Lampiran 8.

5.2.4 Uji Regresi

Uji regresi dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui bagaimana pengaruh ekstrak etanol daun teh hijau terhadap zona inhibisi dari pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi. Pada uji regresi didapatkan nilai R Square sebesar 0,848 menunjukkan bahwa potensi ekstrak etanol daun teh hijau terhadap terbentuknya zona inhibisi pada pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi adalah sebesar 84,8%.

Sedangkan sisa dari nilai tersebut sebesar 15,2% adalah variabel lain yang tidak diteliti dan ikut mempengaruhi hasil penelitian misalnya berapa lama waktu penyimpanan ekstrak etanol daun teh hijau, suhu penyimpanan, atau dari resistensi bakteri itu sendiri.

Hubungan antara kenaikan konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau terhadap besarnya zona inhibisi dapat dinyatakan dengan rumus $Y = A + BX$ dengan Y adalah interval zona inhibisi dan X adalah konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau. Angka koefisien dari A dan B didapat dalam uji regresi. A sebesar 4,018 dan B sebesar 0,679 sehingga rumus di atas dapat dinyatakan dengan $Y = 4,018 + 0,679X$. Dengan menggunakan persamaan tersebut, maka peneliti dapat memprediksi berapa besar konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau yang

dibutuhkan agar dapat menyamai potensi dari *Ceftriaxone* 0,06% sebagai kontrol

positif. Jika dimasukkan dalam persamaan:

$$Y = 4,018 + 0,679X$$

$$32,5 = 4,018 + 0,679X$$

$$28,392 = 0,679X$$

$$X = 41,8$$

Hasil perhitungan tersebut menunjukkan bahwa dibutuhkan konsentrasi 41,8% ekstrak etanol daun teh hijau untuk menyamai efek *Ceftriaxone* 0,06%.

Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 9**.



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek antibakteri ekstrak etanol daun *Camellia sinensis var. assamica* terhadap bakteri *Salmonella Typhi*.

Penelitian ini menggunakan sampel berupa empat isolat *Salmonella Typhi* yang diperoleh dari satu isolat pus dan tiga isolat darah dari Laboratorium Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Teh Hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) termasuk tanaman yang

mudah ditemui dan memiliki banyak manfaat yang telah diteliti pada penelitian sebelumnya. Kandungan dalam daun teh hijau yang diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri adalah alkaloid, flavonoid, katekin, dan tanin. Daun teh hijau didapatkan dalam bentuk simplisia dan diekstraksi di Politeknik Negeri Malang.

Teknik ekstraksi yang digunakan adalah teknik maserasi. Hasil ekstrak berwarna hijau gelap sehingga tidak bisa menggunakan metode dilusi tabung.

Metode penelitian ini adalah difusi sumuran. Metode ini digunakan untuk menganalisis adanya hubungan antara dosis ekstrak etanol daun *Camellia*

sinensis var. assamica dengan lebar diameter zona inhibisi terhadap bakteri *Salmonella Typhi*. Dalam penelitian ini, sebelumnya dilakukan terlebih dahulu uji

eksplorasi dengan meneteskan ekstrak etanol daun teh hijau sebesar 10 μ L dengan konsentrasi 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% di atas agar

yang sudah dilakukan *streaking* bakteri. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa zona inhibisi mulai terbentuk di sekitar tetesan pada konsentrasi 3,125%.

Berdasarkan hasil tersebut, maka dalam menguji potensi antibakteri terhadap

bakteri *Salmonella* Typhi melalui difusi sumuran digunakan 5 macam konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% dengan kontrol negatif berupa aquades, serta kontrol positif berupa *Ceftriaxone* 0,06%.

Dengan diberi perlakuan konsentrasi ekstrak daun teh hijau, maka rata-rata zona inhibisi yang terbentuk pada bakteri *Salmonella* Typhi adalah pada konsentrasi 5% sebesar 10,625 mm, konsentrasi 10% sebesar 12,75 mm, konsentrasi 15% sebesar 14,875 mm, konsentrasi 20% sebesar 17,625 mm, pada konsentrasi 25% sebesar 19,125 mm, dan pada aquades sebagai kontrol negatif sebesar 0 mm, serta pada kontrol positif yang diberikan perlakuan menggunakan *Ceftriaxone* 0,06% sebesar 32,5 mm. Dari data diatas dapat disimpulkan bahwa besar diameter zona inhibisi yang terbentuk disekitar lubang sumuran meningkat sesuai dengan pemberian jumlah konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau, semakin besar konsentrasi maka semakin besar diameter zona inhibisi yang terbentuk disekitar lubang sumuran.

Hambatan dari pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi dikarenakan adanya senyawa-senyawa aktif yang terdapat didalam ekstrak etanol daun teh hijau. Senyawa aktif yang terdapat di dalam daun teh hijau antara lain alkaloid, flavonoid, katekin, dan tanin. Mekanisme antibakteri alkaloid berkaitan dengan kemampuannya menghambat pembentukan dinding sel bakteri sehingga menyebabkan lisis pada sel bakteri. Flavonoid merupakan senyawa yang menghambat reaksi enzimatik. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan menghambat secara kompetitif terhadap sintesis metabolit esensial. Katekin berperan dalam menghambat sintesis asam lemak bakteri. Bakteri membutuhkan asam lemak untuk membentuk membran selnya. Jika sintesis asam lemak dihambat, pembentukan membran sel bakteri dapat

terganggu. Akibatnya, permeabilitas sel bakteri menjadi rusak dan akhirnya sel bakteri akan lisis. Sedangkan tanin berperan sebagai antibakteri pada unit ribosom 50S dan memiliki kemampuan menghambat ikatan peptida sehingga mempendek rantai polipeptida. Hal ini akan menyebabkan metabolisme bakteri menjadi terganggu dan dapat menyebabkan lisis pada sel bakteri.

Hal ini didukung oleh penelitian Farooqui (2015) yang membuktikan bahwa ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) memiliki efek antibakteri yang tinggi terhadap *multidrug resistant Salmonella Typhi* dan *Salmonella Paratyphi A* sensitif dibandingkan dengan isolat bakteri Gram negatif lainnya.

6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau mampu untuk menghambat pertumbuhan *Salmonella Typhi*. Efek hambatan ini meningkat dengan kenaikan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Manfaat klinis yang dapat dikembangkan dari hasil penelitian ini adalah potensi penggunaan daun teh hijau sebagai alternatif terapi pada infeksi MRSA *Salmonella Typhi*. Hambatan pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* diharapkan dapat mengurangi morbiditas dan mortalitas pada pasien demam tifoid serta mengurangi kemungkinan timbulnya resistensi bakteri terhadap antibiotik sehingga dapat mempercepat penyembuhan.

6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dari penelitian ini adalah penelitian ini dilakukan hanya dengan satu metode, yaitu metode difusi sumuran yang hanya dapat meneliti potensi suatu senyawa terhadap hambatan pertumbuhan bakteri, sehingga perlu

dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vitro* maupun secara *in vivo* untuk dapat mengetahui dosis efektif, toksisitas, dan efek samping yang dapat disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol daun teh hijau.

Keterbatasan berikutnya adalah konsentrasi ekstrak yang terlalu pekat sehingga menghambat proses difusi dari ekstrak pada *agar plate*, sehingga *clear zone* tidak terlihat. Peneliti perlu melakukan identifikasi zona inhibisi dengan melakukan *streaking* pada batas terluar warna cokelat di sekitar lubang sumuran dan pada daerah jernih, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Hasilnya didapatkan tidak adanya pertumbuhan bakteri di batas terluar warna cokelat sampai ke dalam (mendekati lubang sumuran), sedangkan pada daerah jernih didapatkan adanya pertumbuhan bakteri. Perlu diingat bahwa zona inhibisi berarti zona yang steril dari bakteri di sekitar lubang sumuran, sehingga dapat diinterpretasikan bahwa ada hambatan terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi* terhadap pemberian ekstrak etanol daun teh hijau.

Keterbatasan lainnya dari penelitian ini adalah tidak dilakukannya penelitian pendahuluan untuk mengetahui kandungan bahan-bahan aktif dalam ekstrak daun teh hijau dan kandungan bahan aktif apa yang memiliki potensi antibakteri paling besar. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai masing-masing zat aktif yang terkandung dalam daun teh hijau.

Diharapkan penelitian ini dapat mendasari perkembangan penggunaan ekstrak daun teh hijau sebagai antibakteri sehingga kelak akan berguna pada masyarakat luas.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun teh hijau memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro*, yang ditunjukkan dengan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau yang digunakan, maka semakin besar diameter zona inhibisi yang terbentuk disekitar lubang sumuran.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan saya menyarankan hal-hal sebagai berikut :

- a) Penelitian lebih rinci mengenai zat aktif yang terkandung dalam daun teh hijau yang dapat berperan sebagai antibakteri.
- b) Penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif daun teh hijau dalam menghambat pertumbuhan bakteri tanpa menimbulkan efek toksik.
- c) Penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas ekstrak daun teh hijau.
- d) Efek samping pemberian ekstrak daun teh hijau.

DAFTAR PUSTAKA

Badan Standarisasi Nasional. 2006. *Cara Uji Mikrobiologi-Bagian 2: Penentuan Salmonella pada Produk Perikanan*, BSN, Jakarta, hal. 13.

Bakhriansyah H.M. 2008. *Penggunaan Antibiotik pada Penanganan Kasus Infeksi*.

Tugas Akhir. Fakultas Farmasi Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin.

Bastos DHM, Ishimoto EY, Marques MOM, Ferri AF, Torres EA. 2006. *Essential*

oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (Ilex paraguariensis)

infusions. (Online) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S08891>

[57505000505](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157505000505) , diakses pada tanggal 12 September 2017).

Cabrera C, Artacho R, Giménez R. 2006. *Beneficial Effects of Green Tea—A*

Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), pp. 79–99. doi:

10.1080/07315724.2006.10719518.

Cahyono B., Meiny S.A, 2011. *Aspek Praktis Metode Pemisahan Bahan Alam*

Organik, Edisi 1, Badan Penerbit Universitas Diponegoro, Semarang, hal.

56-57.

Dahlan S. 2008. *Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan*, Salemba Medika,

Jakarta.

Departemen Kesehatan RI. 1995. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Direktorat

Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

Farooqui, A., Khan, A., Borghetto, I., Kazmi, S. U., Rubino, S., & Paglietti, B. 2015.

Synergistic Antimicrobial Activity of Camellia Sinensis and Juglans Regia

Against Multidrug-Resistant Bacteria. *PloS one*, 10(2), e0118431.

Federer, H. 2014. *Geometric measure theory*. Springer.

Hammad O., Hifnawy T., Omran D., Tantowi M., Girgis N. Ceftriaxone vs Chloramphenicol for Treatment of Acute Typhoid Fever, *Life Science Journal*, 2011.

Handa S.S., Suman S.K., Gennaro L., and Dev Dutt R. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, *International Center for Science and High Technology*, hal. 22-26.

Hartoyo, A. 2003. *Teh dan Khasiatnya bagi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.

Harvey, R. W. S. and Price, T. M. 1974. *Public Health Laboratory Service Monograph Series No.8. Isolation of Salmonellas*. HMSO London. (Online) (http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0201&org=124&c=UK&lang=EN, diakses pada tanggal 15 September 2017)

Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. 1993. *Bactericidal catechins damage the lipid bilayer*. (Online) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527369390323R> , diakses pada tanggal 15 September 2017).

Irmawati, 2017. *Metodologi Penelitian*. Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan, Jakarta, hal. 113.

Jawetz E., Melnick J.L. and Adelberg's., 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 23., Alih Bahasa oleh Huriwati Hartanto, EGC, Jakarta.

Juliantina F.R., Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *JKKI - Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 2008.

Kemenkes RI. 2006. *Pedoman Pengendalian Demam Typhoid*, Warta Perundang-undangan, Jakarta, hal. 2.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2012. *Profil Data Kesehatan Indonesia Tahun 2011*. Jakarta: Kemenkes RI.

Mahmood A., Nurziana N., dan Nor Omar M. Phytochemicals Constituent and Antioxidant Activities in *Musa x Paradisiaca* Flower. *European Journal of Scientific Research*, 2011, 66 (2).

Makkar H.P.S., Dawra R. K., Singh B. Tannin Levels in Leaves of Some Oak Species at Different Stages of Maturity. *J Sci. Food Agriculture*, 1991, 54 (4): 513-519.

Michael G., Shelley G., and Michael S. Microbial Synergy via an Ethanol-Triggered Pathway. *American Society for Microbiology*, 2004, 24(9).

Nazzarudin. 1993. *Teh Pembudidayaan dan Pengolahan*. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya.

Noorhamdani, et al. 2016. Bakteriologi Medik, Obat Antimikroba, Edisi Kedua, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Malang, hal 97-98.

Nugraha A., Swacita I.B.N., Tono P.G., dan Ketut. 2012. *Deteksi Bakteri Salmonella spp dan Pengujian Kualitas Telur Ayam Buras*. Tugas Akhir. Indonesia Medicus Veterinus, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Bali.

O'Hara, Caroline M. Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005, 18 (1): 147-162.

Setiabudy R., 2009. *Farmakologi dan Terapi*, Edisi 5, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, hal. 585-587

Setyamidjaja D. 2000. *Teh: Budidaya dan Pengolahan Pascapanen*. Yogyakarta: Kanisius.

Sjahid R.L. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (Eugenia uniflora L.)*. Tugas Akhir. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.

Somantri, R. 2011. *Kisah dan Khasiat Teh*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

Subekti, Sri R., Wahid N.Y., Rahayu K. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Luka Ikan Mas Koki (*Carassius Auratus*) akibat Infestasi Ektoparasit Argulus. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 2012.

Tille Patricia M., 2013. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 13th Edition, Mobsy, USA.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL, Johnson TR. 2004. *Microbiology: an introduction* (Vol. 9). San Francisco: Benjamin Cummings.

Wang H, Provan GJ, Helliwell K. 2000. *Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis*. *Trends in Food Science & Technology*, 11(4), 152-160.

World Health Organization. 2015. *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*.

