

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK LADA HITAM (*Piper nigrum*)

SEBAGAI ANTIMIKROBA TERHADAP BAKTERI

Escherichia coli

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh :

INDAH BAKTIAN RESTU MARGAWUNI

NIM : 0910710086

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK LADA HITAM (*Piper nigrum*) SEBAGAI
ANTIMIKROBA TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*

Oleh:

Indah Baktian Restu Margawuni

NIM : 0910710086

Telah diuji pada

Hari : Senin

Tanggal : 3 Desember 2012

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes

NIP. 19760519 200501 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Prof.DR.dr. Sanarto S., DTM&H, Sp.MK (K)

NIP. 19481220 198002 1 002

Penguji III/Rembimbing II

dr. Nurul Hidayati, MSc

NIP. 19770706 200501 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi

Prof.Dr.dr.Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, Sp.Par.K

NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Puji Syukur saya ucapkan kepada Allah SWT ,karena hanya dengan berkah dan rahmat-Nya, penulisan tugas akhir ini dapat selesai. Tugas Akhir ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked) pada program pendidikan dokter umum Universitas Brawijaya Malang.

Dalam proses penulisan Tugas Akhir ini, penulis juga banyak didukung oleh berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Dr. dr. Karyono M, SpPA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof.Dr.dr.Sanarto S, DTM&H, SpMK(K) selaku Dosen Pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan mulai dari proses awal pembuatan proposal, penelitian, hingga Tugas Akhir ini selesai.
3. dr.Nurul Hidayati,MSc. selaku Dosen Pembimbing kedua yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membimbing dan mengarahkan penulis selama penulisan Tugas Akhir ini.
4. dr. Indriati Dwi Rahayu, M.Kes selaku dosen penguji satu atas segala saran dan kritik sehingga Tugas Akhir ini dapat menjadi lebih baik.
5. Mas Slamet, Mbak Uci, Mas Hendri, Bu Yati selaku staf Laboratorium Mikrobiologi FKUB untuk keahlian dan ketelatenannya dalam membantu pelaksanaan penelitian.
6. Segenap Anggota Tim Pengelola Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya khususnya Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt. dan dr. Soemardini, MPd.

7. Mama dan bapak yang saya sayangi, terimakasih atas doa dan dukungannya baik moral maupun material, kupersembahkan Tugas Akhir ini untuk kalian.
8. Kakak-kakakku Novi ,Yudha dan keluarga, terimakasih atas doa dan dukungannya.
9. Terima kasih yang spesial untuk Rendra Yulianto yang selalu memberi motivasi serta semangat dalam proses pengerjaan Tugas Akhir ini
10. Sahabat-sahabatku Deby, Jojo, Lita, Agustya, Ryan, Odie, Gung Pram, Tjok serta teman-teman lain yang telah memberi semangat yang luar biasa dalam pengerjaan Tugas Akhir ini.
11. Teman-teman pendidikan dokter angkatan 2009 yang selalu kompak dan memberikan suasana yang menyenangkan dalam menuntut ilmu, semoga tetap kompak sampai kita semua lulus menjadi dokter.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah membantu selama ini, baik secara langsung maupun tidak langsung.

Akhir kata penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga Tugas Akhir ini dapat diterima dan akan bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca yang membutuhkannya.

Malang, 3 Desember 2012

Penulis

ABSTRAK

Margawuni, Indah Baktian Restu. 2012. Uji Efektivitas Ekstrak Lada Hitam (*Piper nigrum*) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. DR. dr. Sanarto Santoso, SpMK (K). (2) dr. Nurul Hidayati, MSc.

Escherichia coli merupakan bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi nosokomial dan resisten terhadap antibiotika tertentu, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan antimikroba alternatif. Salah satunya lada hitam yang memiliki kandungan *flavonoid*, *saponin*, dan *piperine*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak lada hitam sebagai antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Metode yang digunakan adalah dilusi tabung yang terdiri dari tahap penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Ekstrak lada hitam dibuat dengan ekstraksi maserasi menggunakan *etanol* 96%. Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 22,5%; 25%; 27,5%; 30%; dan 32,5%, sedangkan konsentrasi *Escherichia coli* adalah 10^6 CFU/ml. Hasil statistik *one-way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada perubahan konsentrasi ekstrak *etanol* 96% lada hitam terhadap jumlah koloni *Escherichia coli* ($p=0,000$). Uji korelasi menunjukkan adanya hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni (Korelasi, $R = -0,717$; $p=0,000$). Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak lada hitam mempunyai efek antimikroba terhadap *Escherichia coli* dengan Kadar Hambat Minimum (KHM) yang tidak diketahui karena tingkat kekeruhan yang relatif sama dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah 32,5%.

Kata kunci: *antimikroba*, *Escherichia coli*, *lada hitam*.

ABSTRACT

Margawuni, Indah Baktian Restu. 2012. Test Effectivity of Black pepper Extract (*Piper nigrum*) As Antimicrobial Againts *Escherichia coli*. Final Assignment, Medical Education, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. DR. dr. Sanarto Santoso, SpMK (K). (2) dr. Nurul Hidayati, MSc.

Escherichia coli is bacteria that most often cause nosocomial infection and resistant to specific antibiotics. Therefore, it should be conducted a research to get an alternative antimicrobial. One of them is black pepper which contains *flavonoid*, *saponin*, and *piperine*. The objective of this research is to determine black pepper extract as antimicrobial against *Escherichia coli*. The research used tube dilution method that consist of determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Black pepper extract is made by maceration extraction using *etanol* 96%. The concentration used were 22,5%; 25%; 27,5%; 30%: and 32,5%, and concentration of *Escherichia coli* is 10^6 CFU/ml. The result of *one-way ANOVA* statistical test showed that there is significant differences in the concentration change of extract *etanol* 96% black pepper on the amount of colony *Escherichia coli* ($p=0,000$). Correlation test showed that there is a correlation between concentration of extract with the amount of colony (Correlation, $R = -0,717$; $p=0,000$). Based on the result, it can be concluded that extract of black pepper have antimicrobial effect on *Escherichia coli* with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) which is unknown because of the relatively similar levels of turbidity and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) is 32,5% .

Keywords: *antimicrobial, Escherichia coli, black pepper.*

DAFTAR ISI

JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	
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.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademik.....	4
1.4.2 Manfaat Klinis.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.1 Epidemiologi	5



2.1.2	Morfologi dan Identifikasi.....	6
2.1.3	Taksonomi	10
2.1.4	Ciri-ciri Pertumbuhan.....	11
	2.1.4.1 Media Eosin Methylene Blue	12
	2.1.4.2 Media MacConkey Agar	13
	2.1.4.3 Media MacConkey Broth	13
2.1.5	Klasifikasi serologis	14
2.1.6	Patogenesis <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.7	Manifestasi Klinis <i>Escherichia coli</i>	17
2.2	Tanaman Lada Hitam	20
	2.2.1 Asal Usul Lada hitam	20
	2.2.2 Morfologi dan Identifikasi Tanaman Lada hitam	21
	2.2.3 Taksonomi Lada hitam.....	24
	2.2.4 Kandungan Lada hitam.....	25
	2.2.4.1 Flavonoid	25
	2.2.4.2 Saponin	27
	2.2.4.3 Piperine.....	28
	2.2.5 Pemakaian Dalam Pengobatan	29
2.3	Cara Kerja Antimikroba.....	29
	2.3.1 Menghambat Sintesis Dinding Sel	29
	2.3.2 Menghambat Fungsi Membran Sel	30
	2.3.3 Menghambat Sintesa Protein.....	30
	2.3.4 Menghambat Sintesis Asam Nukleat	31
	2.3.5 Menghambat Metabolisme Se IBakteri.....	31
2.4	Uji Kepekaan Antimikroba	31

2.4.1 Metode Dilusi Tabung.....	31
2.4.2 Metode Difusi Cakram	32

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian	34
3.2 Hipotesis Penelitian	35

BAB 4 METODE PENELITIAN

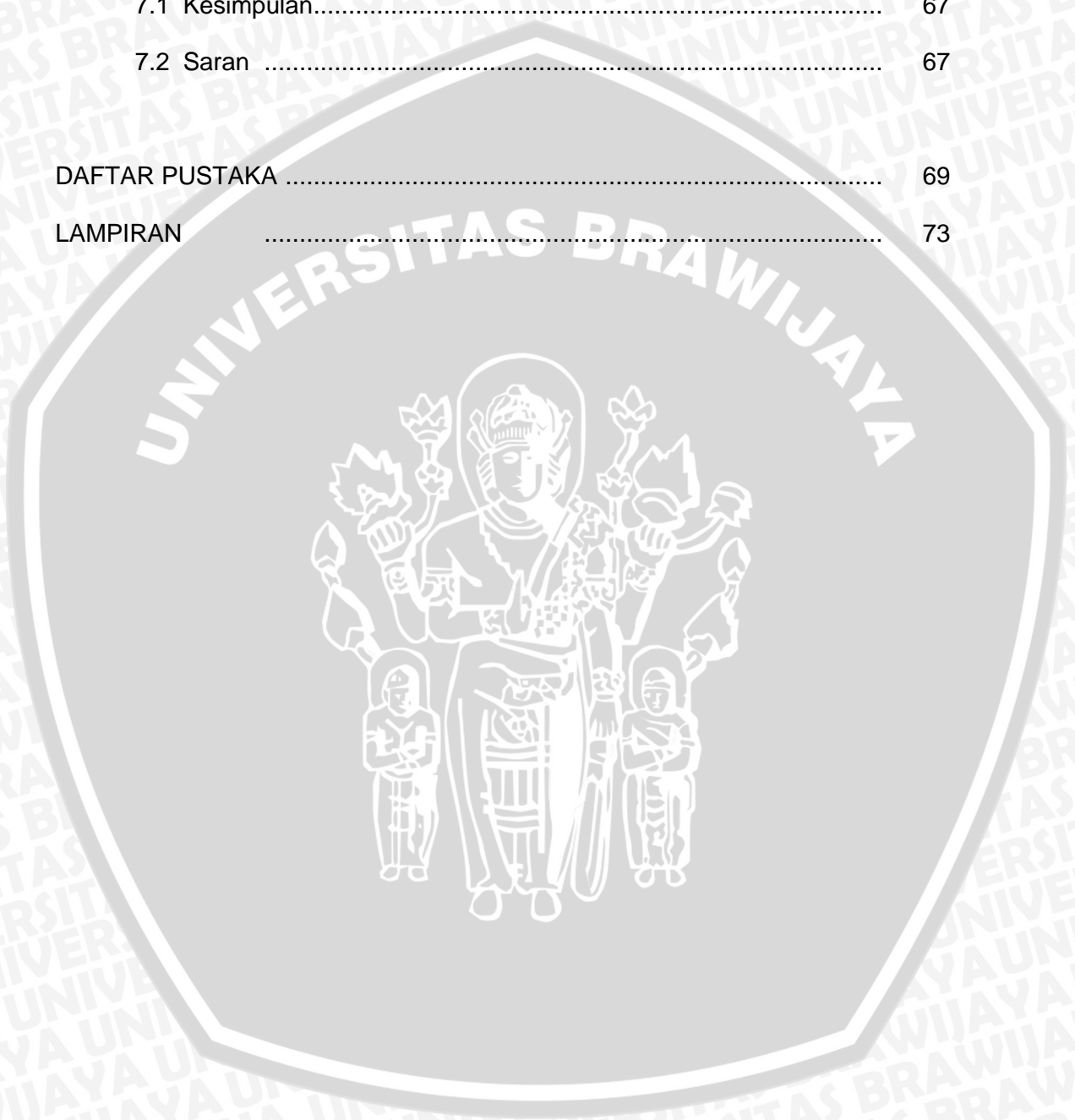
4.1 Desain Penelitian.....	36
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	36
4.3 Sampel Penelitian.....	36
4.4 Variable Penelitian.....	37
4.4.1 Variable Bebas.....	37
4.4.2 Variable Tergantung.....	38
4.5 Definisi Operasional	37
4.5.1 Isolat bakteri <i>E.coli</i>	38
4.5.2 Ekstrak lada hitam	38
4.5.3 Kadar Hambat Minimal (KHM)	38
4.5.4 Kadar Bunuh Minimal (KBM)	38
4.5.5 Kontrol Bakteri (Kontrol Positif)	38
4.5.6 Kontrol Bahan (Kontrol Negatif)	39
4.5.7 <i>Original Inoculum</i>	39
4.6 Alat dan Bahan Penelitian	39
4.6.1 Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Ekstrak Lada Hitam... ..	39
4.6.2 Alat dan Bahan Untuk Pewarnaan Gram Bakteri.....	40

4.6.3	Alat dan Bahan Untuk Pembenihan Agar <i>MacConkey</i>	40
4.6.4	Alat dan Bahan Untuk Pembenihan Agar EMB	40
4.6.5	Alat dan Bahan Untuk TSI.....	41
4.6.6	Alat dan Bahan Untuk Uji Dilusi Tabung.....	41
4.7	Rancangan Operasional Penelitian.....	42
4.7.1	Pembuatan Ekstrak Lada Hitam.....	42
4.7.2	Identifikasi Ulang Bakteri <i>Escherichia coli</i>	43
4.7.2.1	Pewarnaan Gram	43
4.7.2.2	Triple Sugar Iron (TSI)	44
4.7.2.3	Tes Biokimia (IMVIC MU)	45
4.7.2.4	Pembenihan Agar pada Mac Conkey	47
4.7.2.5	Pembenihan pada EMB	47
4.8	Prosedur Penelitian.....	48
4.8.1	Preparasi Uji Bakteri	48
4.8.2	Pengujian Efek Antimikroba	49
4.9	Analisis Data	50
4.10	Alur Kerja Penelitian	51

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1	Data Hasil Penelitian	52
5.1.1	Identifikasi Bakteri <i>Escherichia coli</i>	52
5.2	KHM dan KBM Berdasarkan Hasil Pengamatan dan Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri <i>Escherichia coli</i>	54
5.3	Analisis Data secara statistik	59

BAB 6 PEMBAHASAN.....	63
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan.....	67
7.2 Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN	73



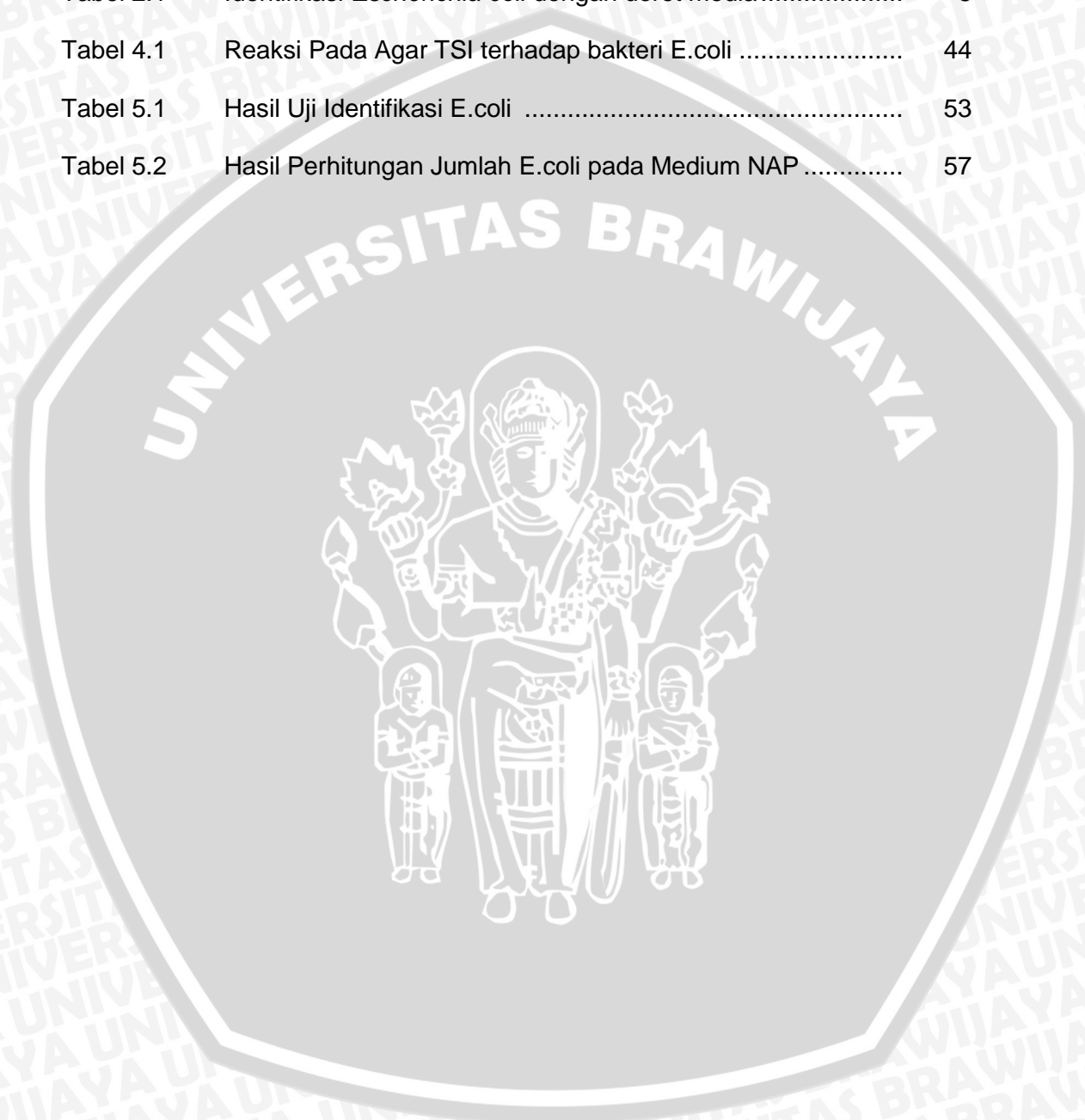
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Pewarnaan Gram <i>E.coli</i>	6
Gambar 2.2	<i>Escherichia coli</i>	11
Gambar 2.3	Uji Identifikasi <i>E.coli</i> pada EMB.....	12
Gambar 2.4	Uji Identifikasi <i>E.coli</i> pada MacConkey Agar	13
Gambar 2.5	Tanaman Lada	23
Gambar 2.6	Daun dan Buah Lada	24
Gambar 2.7	Struktur Kimia Saponin	28
Gambar 3.1	Skema Kerangka Konsep Penelitian	34
Gambar 4.1	Alur Kerja Penelitian	51
Gambar 5.1	Uji Identifikasi Bakteri <i>E.coli</i>	53
Gambar 5.2	Uji Dilusi Tabung Perbandingan Tingkat Kejernihan	55
Gambar 5.3	Pertumbuhan koloni <i>Escherichia coli</i> pada Medium NAP	56
Gambar 5.4	Grafik rata-rata jumlah koloni bakteri <i>Escherichia coli</i> dengan kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak lada hitam.....	59
Gambar 5.5	Grafik linieritas ekstrak lada hitam (<i>Piper nigrum</i>) terhadap jumlah koloni <i>E.coli</i>	61
Gambar L2.1	Mikroskop	74
Gambar L2.2	Spektrofotometri.....	74
Gambar L2.3	Vortex	74
Gambar L2.4	Lada hitam	74
GambarL3.1	Hasil Inkubasi Kontrol Kuman <i>Escherichia coli</i>	75
GambarL3.2	Koloni bakteri pada Medium NAP.....	75



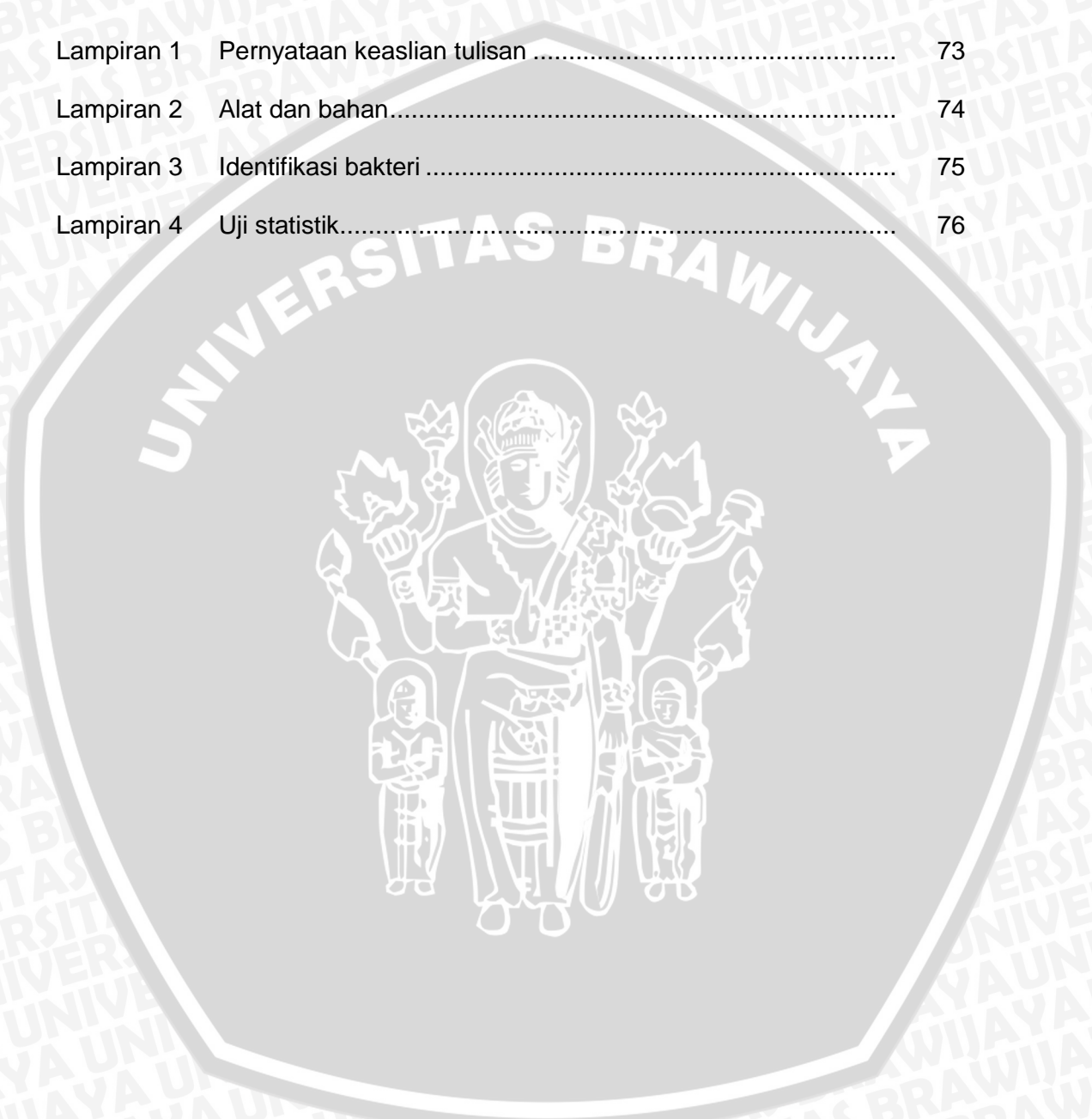
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Identifikasi <i>Escherichia coli</i> dengan deret media	8
Tabel 4.1	Reaksi Pada Agar TSI terhadap bakteri E.coli	44
Tabel 5.1	Hasil Uji Identifikasi E.coli	53
Tabel 5.2	Hasil Perhitungan Jumlah E.coli pada Medium NAP	57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pernyataan keaslian tulisan	73
Lampiran 2	Alat dan bahan.....	74
Lampiran 3	Identifikasi bakteri	75
Lampiran 4	Uji statistik.....	76



DAFTAR SINGKATAN

CFU = *Colony Forming Unit*

OI = *Original Inoculum*

E.coli = *Escherichia coli*

KBM = *Kadar Bunuh Minimum*

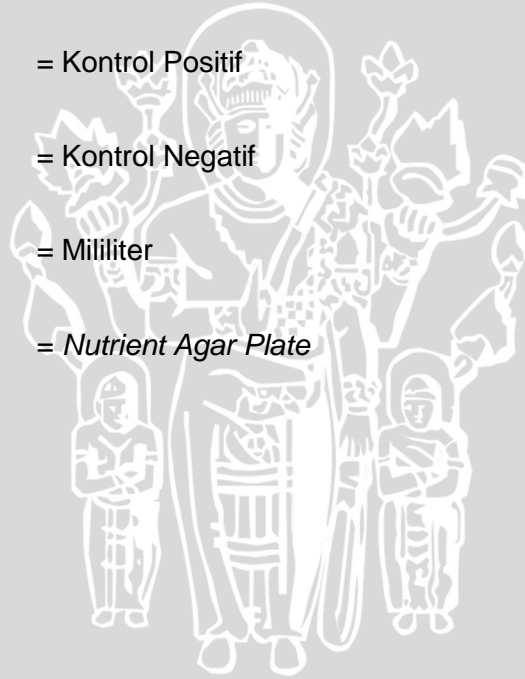
KHM = *Kadar Hambat Minimal*

KP = *Kontrol Positif*

KN = *Kontrol Negatif*

mL = *Milliliter*

NAP = *Nutrient Agar Plate*



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Dewasa ini kita seringkali menjumpai penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Penyakit-penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri mudah sekali menular dari satu penderita ke orang lain yang sehat maupun yang sedang sakit. Bahkan, penularan ini juga banyak terjadi di pusat-pusat pelayanan kesehatan, rumah sakit contohnya. Penularan infeksi di rumah sakit dikenal juga dengan istilah infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial banyak terjadi di seluruh dunia dengan kejadian terbanyak di negara miskin dan negara yang sedang berkembang (Hastomo, 2009).

Suatu penelitian yang dilakukan oleh WHO menunjukkan bahwa sekitar 8,7% dari 55 Rumah Sakit dari 14 negara yang berasal dari Eropa, Timur Tengah, Asia Tenggara dan Pasifik tetap menunjukkan adanya infeksi nosokomial, dengan Asia Tenggara mencapai 10,00%. Walaupun ilmu pengetahuan dan penelitian tentang mikrobiologi meningkat pesat pada 3 dekade terakhir dan sedikit demi sedikit resiko infeksi dapat dicegah, tetapi semakin meningkatnya pasien-pasien dengan penyakit immunocompromised, bakteri yang resisten antibiotik, super infeksi virus dan jamur serta prosedur invasif yang dapat menyebabkan infeksi nosokomial dan menimbulkan kematian sebanyak 88.000 kasus setiap tahun. Selain itu mikroorganisme yang berada di rumah sakit lebih berbahaya dan lebih resisten terhadap obat jika dibandingkan dengan mikroorganisme yang berada di masyarakat (Hastomo, 2009).

Enterobacteriaceae adalah keluarga bakteri yang bertanggung jawab pada sekitar 50% infeksi nosokomial. Penyebab paling sering menyebabkan infeksi nosokomial pada keluarga bakteri ini adalah *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* dan *Serratia marcencens*. Selain itu *E.coli* adalah penyebab utama infeksi saluran kemih (urinary tract infection/UTI) dan juga dapat menyebabkan meningitis akut, pneumonia, infeksi intra-abdominal, infeksi enterik dan lain-lain (Noviana, 2004).

Di antara banyak spesies yang termasuk dalam *Enterobactericeae* mungkin *Escherichia coli* adalah salah satu bakteri yang paling populer di masyarakat. *Escherichia coli* sebenarnya merupakan flora normal atau lebih biasa dikenal dengan istilah bakteri baik pada saluran pencernaan kita, tetapi bila ada suatu perubahan pada saluran pencernaan kita, bakteri ini dapat berubah fungsi menjadi merugikan. Infeksi dari *Escherichia coli* dapat mengakibatkan diare dan infeksi saluran kemih, yang tentunya menjadi salah satu masalah kesehatan. Untuk mengatasi permasalahan infeksi dalam tubuh, kita dapat menggunakan obat-obatan antibakteri dengan tujuan menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri tersebut. Namun, seiring dengan berjalannya waktu, penggunaan antibakteri telah dibatasi karena efek samping dan masalah resistensinya. Oleh karena itu dibutuhkan suatu obat antibakteri alternatif dalam hal perawatan terhadap penyakit menular tersebut. *Medicinal herbs*/tanaman obat adalah sumber yang dianggap mewakili adanya kandungan yang kaya dari agen kemoterapeutik untuk antibakterial dan antifungi (Agnol *et al.*, 2003)

Pada saat ini banyak sekali pengobatan alami yang belum diketahui secara luas contohnya adalah biji lada hitam, walaupun sebenarnya masyarakat telah mengenal jenis rempah ini sejak dahulu. Lada hitam selain digunakan sebagai

bumbu masak dan bahan obat-obatan dapat pula berfungsi sebagai bahan pembuatan minuman kesehatan dan bahan pembuatan parfum (Sarpian, 2007).

Pada beberapa penelitian telah diketahui bahwa lada hitam memiliki berbagai senyawa kimia seperti *flavonoid*, *saponin*, *piperine*, dan minyak atsiri. Lada hitam memiliki beberapa khasiat antaranya adalah untuk melancarkan menstruasi, meredakan serangan asma, meringankan gejala rematik, mengatasi diare, serta menyembuhkan rasa sakit kepala. Selain itu, pada lada hitam terkandung antioksidan, antikanker, diuretik, diaforetik dan analgesik (Muhammad, 2011). Dari penelitian yang telah dilakukan juga diketahui bahwa lada hitam terbukti efektif menghambat pertumbuhan bakteri lain seperti *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* (Sutedja dan Agustina, 1991).

Berdasarkan beberapa-beberapa informasi tersebut diatas, maka sangat menarik untuk dilakukan penelitian lanjutan dan terfokus untuk mengetahui apakah ekstrak biji lada hitam memiliki efek antimikroba terhadap *Escherichia coli* . Sehingga dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan penyakit yang ditimbulkan oleh *Escherichia coli*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) efektif sebagai anti mikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efektifitas ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) sebagai anti mikroba terhadap bakteri *Escherichia coli*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak lada hitam terhadap *Escherichia coli*.

1.3.2.2. Mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak lada hitam terhadap *Escherichia coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1.4.1.1. Memberikan informasi yang dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut mengenai efek antimikroba lada hitam.

1.4.1.2. Mengembangkan ilmu pengetahuan, terutama mengenai bahan alam yang dapat digunakan sebagai antimikroba.

1.4.2 Manfaat Klinis

1.4.2.1. Melalui penelitian ini diharapkan dapat diperoleh pengobatan alternatif dengan menggunakan bahan alam di sekitar kita dengan efek samping yang lebih minimum dibandingkan obat sintesis yang dijual di pasaran.

1.4.2.2. Menambah koleksi bahan antimikroba alam.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan spesies bakteri dari genus *Escherichia* yang sering diisolasi dari spesimen klinik. *Escherichia coli* sering digunakan sebagai objek dalam penelitian ilmiah dibandingkan dengan mikroorganisme yang lain. Organisme ini merupakan penghuni utama di usus besar dan juga merupakan isolat penyebab utama infeksi saluran kemih dan luka infeksi, pneumonia, meningitis serta sepsis. Penelitian-penelitian yang baru juga menunjukkan bahwa galur tertentu dari *Escherichia coli* juga merupakan patogen intestinal dan menyebabkan berbagai penyakit gastrointestinal (Dzen dkk., 2003).

2.1.1 Epidemiologi

Escherichia coli sangat dikenal sebagai bakteri patogen penyebab infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial adalah infeksi yang didapatkan ketika seseorang dirawat di rumah sakit. Infeksi nosokomial yang paling umum adalah infeksi saluran kemih, pneumonia pernafasan, infeksi pada luka pembedahan, infeksi kulit dan infeksi saluran pencernaan. *Escherichia coli* menempati urutan kedua tertinggi penyebab infeksi nosokomial setelah *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini bertanggung jawab atas 12-50% kejadian infeksi nosokomial, 4% dari kasus diare karena infeksi, juga 90% dari kejadian infeksi nosokomial pada saluran kemih tanpa komplikasi. Selain itu, *Escherichia*

coli adalah penyebab dari hampir 80% kejadian meningitis di seluruh dunia (Madappa, 2011).

Berdasarkan data yang diperoleh dari *US Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, disebutkan bahwa sedikitnya 2000 orang Amerika dirawat di rumah sakit dan 60 orang mati per tahunnya akibat efek langsung dari infeksi *Escherichia coli* dan komplikasinya. Studi terbaru menyebutkan bahwa biaya yang dihabiskan oleh pemerintah Amerika mencapai 405 juta dolar untuk mengatasi dampak dari infeksi *Escherichia coli*, diantaranya 370 juta dollar untuk kematian prematur, 30 juta dollar untuk perawatan kesehatan, dan 5 juta dollar sebagai efek dari penurunan produktivitas masyarakat (Clark, 2005).

Escherichia coli adalah bakteri yang bertempat tinggal sebagai normal flora di usus besar manusia, hewan, dan insekta. Selain tentunya dapat dengan mudah dijumpai di tanah, air, sampah (Dzen dkk., 2003). Sehingga penyebaran dari bakteri ini sangat luas dan dapat dengan mudah sekali menular. *Escherichia coli* juga sering dimanfaatkan dalam bidang penelitian molekular sebagai vektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu, terkait dengan pertumbuhan yang sangat cepat dan penanganannya yang relatif mudah.

2.1.2 Morfologi dan Identifikasi



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Escherichia coli*

Bakteri ini pertama kali ditemukan oleh seorang dokter hewan dari Jerman Theodor Escherich pada tahun 1885 dalam studinya mengenai sistem pencernaan pada bayi hewan. Pada saat itu bakteri ini digambarkan sebagai komunitas bakteri koli yang membangun segala perlengkapan patogenisitasnya di infeksi saluran pencernaan. Bakteri *Escherichia coli* merupakan organisme penghuni utama di usus besar, hidupnya komensal dalam kolon manusia dan diduga berperan dalam pembentukan vitamin K yang berperan penting untuk pembekuan darah (Munif, 2009).

Secara morfologi, bakteri ini berbentuk batang (basil), berukuran kecil (0,5x3,0mm), bersifat gram negatif dan tidak membentuk spora. Bersifat motil karena memiliki flagella yang peritrikus (terletak di seluruh permukaan tubuh), hal ini akan membedakan bakteri ini dengan bakteri dari keluarga Pseudomonadaceae dan Vibrionaceae yang memiliki flagella polar. Berdasarkan sifat-sifatnya bakteri *Escherichia coli* ini termasuk dalam keluarga Enterobacteriaceae (Dzen dkk., 2003).

Selnya bisa terdapat tunggal, berpasangan, dan dalam rantai pendek, biasanya tidak berkapsul. Bakteri ini bersifat aerobik dan dapat juga aerobik fakultatif dalam keadaan tertentu. *Escherichia coli* merupakan penghuni normal usus, seringkali menyebabkan infeksi dalam kondisi yang abnormal atau saat status imun dari induknya sedang lemah. Kapsula atau mikrokapsula terbuat dari asam – asam polisakarida. Mukoid kadang–kadang memproduksi pembuangan ekstraselular yang tidak lain adalah sebuah polisakarida dari spesifitas antigen K tertentu atau terdapat pada asam polisakarida yang dibentuk oleh banyak *Escherichia coli* seperti pada Enterobacteriaceae. Selanjutnya digambarkan sebagai antigen M dan dikomposisikan oleh asam kolanik (Farmasi USD, 2008).

Escherichia coli memfermentasikan laktosa dan memproduksi indol yang dapat digunakan sebagai acuan untuk mengidentifikasi bakteri pada makanan dan air. Koloni dari bakteri *Escherichia coli* berbentuk besar (2-3 mm), circular, konveks dan tidak berpigmen pada nutrient dan media darah.

Escherichia coli dapat bertahan hingga suhu 60°C selama 15 menit atau pada 55°C selama 60 menit.

Untuk mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* ini, selain dengan melihat morfologinya dengan metode pewarnaan gram, untuk hasil yang lebih pasti harus dilakukan identifikasi bakteri dengan menggunakan media-media pertumbuhan, misalnya pada media Kligler Iron Agar (KIA), Semi Solid Sucrose medium (SSS), Lysine Iron Agar (LIA), Motility Indol Ornithine (MIO). Bakteri *Escherichia coli* memiliki ciri pertumbuhan yang khas pada masing-masing media pertumbuhan

Salah satu uji idenifikasi lainnya adalah medium *triple sugar iron* (TSI), yang seringkali digunakan untuk membedakan *Salmonella* dan *Shigella* dari bakteri enterik batang gram negatif lain yang terdapat dalam biakan tinja (Dzen dkk., 2003).

Tabel 2.1 Hasil identifikasi *Escherichia coli* dengan deret media (Raharni dkk., 2000)

Media Hasil	Identifikasi
KIA	Timbul gas, warna media berubah menjadi kuning
SSS	Media berubah dari merah menjadi kuning, terjadi pergerakan bakteri
LIA	Media tetap berwarna ungu, asam sulfide (H ₂ S)

	negative
MIO	Terjadi perubahan warna media dari ungu ke kuning, terjadi pergerakan bakteri, dan timbul cincin merah setelah ditambahkan pereaksi covacs

Pada media KIA, terjadi perubahan warna indikator fenol dari merah ke kuning dan dalam posisi terangkat karena adanya asam dan gas sebagai produk pemecahan laktosa dan dektrosa.

Terjadinya perubahan warna media SSS dari merah ke kuning disebabkan adanya asam sebagai hasil fermentasi sukrosa oleh bakteri. Pada media SSS terjadi pergerakan bakteri (*motility*), didaerah tusukan (*butt*) terlihat keruh dan melebar.

Media LIA dan MIO pada prinsipnya digunakan untuk mengetahui reaksi bakteri terhadap asam amino, dalam hal ini lisin pada LIA dan ornithin pada MIO. Selain itu media LIA dapat juga digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang diperiksa membentuk asam sulfida atau tidak. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan pH media, dan juga tidak dihasilkan asam sulfida. Jadi bakteri tidak dapat memecah lisin dan tidak membentuk asam sulfida.

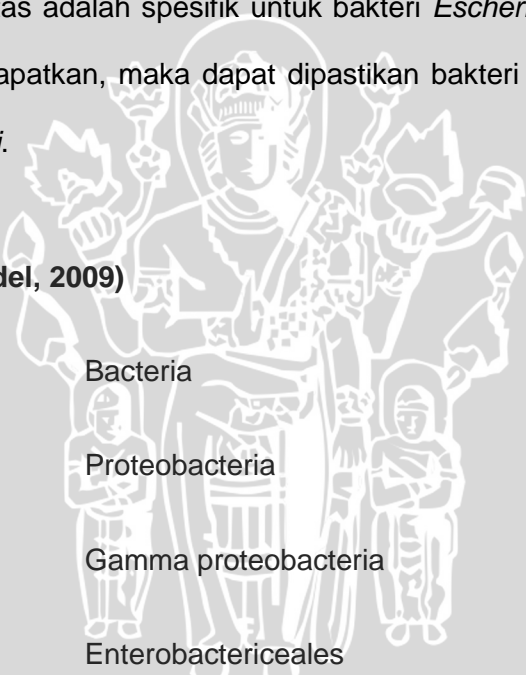
Media MIO digunakan untuk mengetahui reaksi terhadap ornitin, dapat juga digunakan untuk mengetahui adanya pergerakan bakteri yang diperiksa, serta kemampuannya menghasilkan indol. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terjadi perubahan warna media dari ungu menjadi kuning, pada bagian tusukan terlihat keruh dan melebar, berarti bakteri yang diperiksa dapat bergerak, serta terbentuk cincin merah (indol) setelah ditambah pereaksi Covacs.

Perubahan warna media disebabkan karena terjadinya dekarboksilasi ornitin oleh bakteri. Dilepaskannya karbondioksida menyebabkan kenaikan pH media, akibatnya terjadi perubahan warna indikator brom kresol dari ungu menjadi kuning (Raharni dkk., 2000).

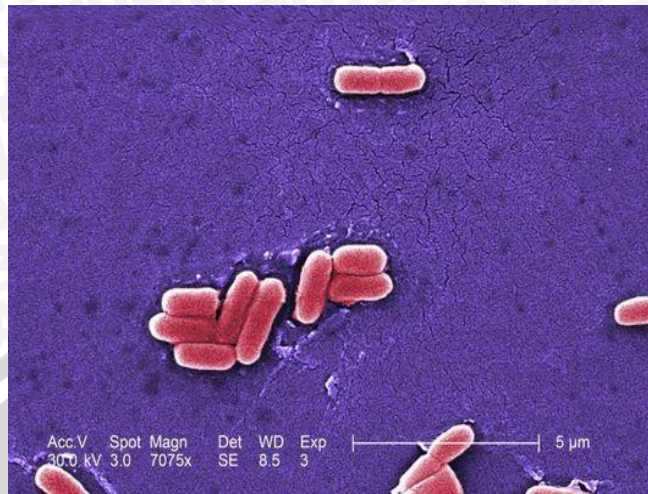
Medium TSI dapat digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri memfermentasi glukosa, laktosa atau fruktosa, memproduksi gas serta H₂S. Hasil pengamatan menunjukkan koloni yang berwarna kuning pada bagian *siant* dan *butt* serta adanya gelembung gas.

Hasil-hasil di atas adalah spesifik untuk bakteri *Escherichia coli*, jadi bila hasil di atas sudah didapatkan, maka dapat dipastikan bakteri yang diuji adalah bakteri *Escherichia coli*.

2.1.3 Taksonomi (Adel, 2009)



Kingdom	:	Bacteria
Phylum	:	Proteobacteria
Class	:	Gamma proteobacteria
Order	:	Enterobacteriaceales
Family	:	Enterobacteriaceae
Genus	:	<i>Escherichia</i>
Species	:	<i>Escherichia coli</i>



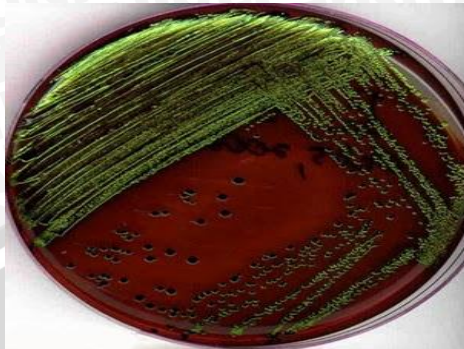
Gambar 2.2 *Escherichia coli* (Encyclopedia of Life,2006)

2.1.4 Ciri-Ciri Pertumbuhan

Escherichia coli merupakan bakteri fakultatif anaerob, kemoorganotropik, mempunyai tipe metabolisme fermentasi dan respirasi tetapi pertumbuhannya paling sedikit banyak di bawah keadaan anaerob.pertumbuhan yang baik pada suhu optimal 37°C pada media yang mengandung 1% peptone sebagai sumber karbon dan nitrogen.

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, uji indole positif dan mampu memfermentasi berbagai karbohidrat seperti glukosa, laktosa, manitol dan arabinosa.

2.1.4.1 Media Eosin Methylene Blue



Gambar 2.3 Uji identifikasi *E.coli* pada EMB

Media ini mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk memilah bakteri yang memfermentasi laktosa seperti *Escherichia coli* dengan bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa seperti *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Bakteri yang memfermentasi laktosa menghasilkan koloni dengan inti berwarna gelap dengan kilap logam (*metallic sheen*), sedangkan bakteri lain yang dapat tumbuh koloninya tidak berwarna. Adanya eosin dan methylene blue membantu mempertajam perbedaan tersebut. Namun demikian jika media ini digunakan pada tahap awal, karena kuman lain juga tumbuh terutama *P.aeruginosa* dan *Salmonella sp* dapat menimbulkan keraguan. Bagaimanapun media ini sangat baik untuk mengkonfirmasi bahwa kontaminan tersebut adalah *Escherichia coli*.

2.1.4.2 Media MacConkey Agar



Gambar 2.4 Uji identifikasi *E.coli* pada MacConkey Agar

Media ini mempunyai keistimewaan memilah bakteri enterik gram negatif yang memfermentasi laktosa, karena media ini mengandung laktosa, *crystal violet* dan *neutral red bile salt*. Kemampuan *Escherichia coli* memfermentasi laktosa menyebabkan penurunan pH, sehingga mempermudah absorpsi *neutral red* untuk mengubah koloni menjadi merah bata dan *bile*/ empedu diendapkan. Koloni lain (*S. aureus*, *P.aeruginosa* dan *Salmonella*), bila tumbuh tidak akan berwarna karena tidak mampu memfermentasi laktosa. Bakteri lain yang dapat tumbuh pada media ini antara lain *Enterobacter*; *Proteus*; *Salmonella*; *Shigella*, *Aerobacter*; *Enterococcus*.

2.1.4.3 Media MacConkey Broth

Walaupun media tidak tercantum di FI-IV, sebenarnya media ini bermanfaat sekali dalam memilah *Escherichia coli* dari bakteri lain terutama *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Adanya Oxgall dalam media berperan dalam menghambat bakteri gram positif lain seperti *S. aureus*. Kandungan laktosa sangat penting untuk memilah *Escherichia coli* dari bakteri lain yang tidak memfermentasi laktosa, terutama *P. aeruginosa* dan *Salmonella*.

Fermentasi laktosa oleh *Escherichia coli* menyebabkan pH turun. Kondisi asam akan menyebabkan *bromo cresol purple* (media berwarna ungu) berubah menjadi kuning (media berwarna kuning) dan adanya pembentukan gas yang dapat diamati pada tabung Durham. Sedangkan *Salmonella* dan *P. aeruginosa* tidak dapat mengubah warna media karena tidak memfermentasi laktosa, sedangkan bakteri lain yang mampu memfermentasi laktosa dan mempunyai ekspresi pada media seperti *Escherichia coli* adalah *Enterobacter aerogenes*. Adapun cara memilah *E. aerogenes* antara lain dengan reaksi indole. *Escherichia coli* mempunyai reaksi positif, sedang *E. aerogenes* bereaksi negatif. Dengan sifat tersebut media ini sangat baik untuk memilah *Escherichia coli* dari bakteri lain pada tahap awal terutama *P. aeruginosa*, *S. aureus* dan *Salmonella* (Suwandi, 1999).

2.1.5 Klasifikasi Serologis

Pembagian *Escherichia coli* berdasarkan reaksi serologis terutama ditentukan atas tipe antigen O, tipe antigen H dan apabila dimungkinkan dengan tipe antigen K. Terdapat lebih dari 164 antigen O, 100 antigen K, dan 50 antigen H untuk *Escherichia coli*. Antigen H selanjutnya dibagi lagi menjadi subgroup L, A, dan B. Penentuan profil antigen dari berbagai galur berguna untuk penelitian epidemiologi dan beberapa penelitian yang berhubungan dengan jenis penyakit diare. Contohnya serotipe O157:H7 memproduksi Shigalike toxin yang bertanggung jawab pada kolitis hemoragik sedangkan serotipe O78:H11 dan O78:H12 hampir semuanya adalah enterotoksigenik. Tipe antigen yang lain seperti O111a,111b:H2 berhubungan dengan diare infantile, dan galur O124:H30

adalah enteroinvasif dan menyebabkan disentri basiler yang mirip dengan yang disebabkan oleh *Shigella* (Dzen dkk., 2003)

Klasifikasi serologis sebenarnya sudah berkembang cukup luas sehingga bisa mengikutsertakan antigen F-fimbrial, tetapi hanya antigen O, K, dan H saja yang sampai saat ini lazim digunakan dalam proses klasifikasi *Escherichia coli*. Analisis kimia dari gugus gula pada lipopolisakarida yang terdapat pada *Escherichia coli* memungkinkan definisi dari kemotipe *Escherichia coli* yang seringkali juga sesuai dengan reaksi serologis silang antara serogroup O yang berbeda dan *Salmonella* (Sussman, 1997)

Antigen K dikenal juga dengan nama antigen kapsuler yang berasal dari bahasa Jerman “kapsel” dan digunakan untuk menjelaskan antigen kapsul polisakarida dari bakteri enterik. Penelitian yang baru menunjukkan bahwa antigen K tertentu dari *Escherichia coli* berupa senyawa protein (bukan polisakarida) dan membentuk suatu fimbria

Antigen H dikenal juga dengan nama antigen flagela, berasal dari bahasa Jerman “hauch” yang artinya “nafas” adalah protein yang dapat didenaturasi atau dihilangkan dengan pemanasan atau alcohol. Antigen H ini dapat diaglutinasikan oleh anti-H antibodies terutama IgG.

Antigen O dikenal juga dengan nama antigen somatik (berasal dari bahasa Jerman “ohne” yang artinya “badan”) tersusun atas senyawa lipopolisakarida (LPS) yang terdiri dari tiga regions (Dzen dkk., 2003).

2.1.6 Patogenesis *Escherichia coli*

Escherichia coli terdiri atas beragam grup mikroorganisme yang dapat menginfeksi berbagai sistem hospes dan memproduksi sejumlah besar

faktor virulensi mulai bentuk structural sampai toksin yang diekskresikan. Kepentingan relatif dari faktor-faktor ini tidak hanya pada genetik galur tertentu tetapi juga pada tempat infeksi dan kondisi hospesnya.

1. Faktor Permukaan

Escherichia coli mengandung antigen tipe K1 yang memiliki keunikan diantara antigen kapsuler *Escherichia coli* yang lain karena kapsul ini tahan terhadap proses pembunuhan baik oleh neutrofil maupun serum normal manusia. Tipe antigen O pada *Escherichia coli* juga penting karena antigen ini memiliki predileksi ikatan pada reseptor yang terdapat pada endothelium vaskuler dan lapisan epitel pada plexus choroidalis dan ventriculus dalam otak anak menceit

Fimbria dari bakteri *Escherichia coli* dibagi menjadi 2 kelompok besar, mannose resistant fimbriae dan mannose sensitive fimbriae, Fimbria yang sensitif terhadap manosa disebut juga fimbria tipe 1.

2. Enterotoksin

Escherichia coli memproduksi beberapa enterotoksin yang bertanggung jawab terhadap sebagian besar kasus diare karena infeksi. Produksi dari enterotoksin ini sangat bergantung dari adanya plasmid yang menyandi produksi toksin. Galur *Escherichia coli* yang memiliki plasmid tertentu akan memproduksi heat-labile enterotoxin (LT) yang mirip enterotoksin pada *Vibrio cholerae*. LT akan merangsang aktivitas adenilsiklase dalam sel epitel mukosa usus halus, yang kemudian akan meningkatkan permeabilitas permukaan intestinal, yang menyebabkan pengeluaran cairan dan elektrolit. Selain LT, *Escherichia coli* juga memproduksi dua enterotoksin yang tahan panas, heat-stable enterotoksin (ST) yaitu STa (ST-I) dan STb (ST-II)

3. Verotoksin (shigalike toxin)

Escherichia coli yang diinfeksi oleh bakteriofag dapat memproduksi sitotoksin yang disebut verotoksin. Disebut verotoksin karena efek sitotoksiknya yang menetap pada kultur sel dari jaringan Vero, yaitu suatu lapisan sel yang berasal dari sel ginjal kera. Ada 2 jenis verotoksin yaitu VT-1 dan VT-2. Keduanya menghambat sintesis protein pada sel eukariotik. Toksin ini berhubungan dengan tiga sindroma pada manusia yaitu diare, kolitis hemoragik, dan hemolytic uremic syndrome (HUS) (Dzen dkk., 2003).

2.1.7 Manifestasi Klinis *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* yang telah menginfeksi manusia dapat menimbulkan bermacam-macam gejala dan keluhan. Adapun beberapa manifestasi dari infeksi *Escherichia coli* yang paling sering dijumpai adalah:

1. Infeksi Saluran Kemih

Infeksi saluran kemih (ISK) adalah infeksi akibat berkembangbiaknya mikroorganisme di dalam saluran kemih yang di dalam keadaan normal air kemih tidak mengandung bakteri. ISK paling banyak disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dengan kejadian hampir 39,4%. (Samirah dkk, 2006). Wanita lebih sering terkena ISK karena perbedaan struktur anatomisnya, kematangan seksual, perubahan traktus urogenitalis selama kehamilan dan kelahiran, serta adanya tumor. Gejala-gejala ISK antara lain adalah poliuria, disuria, hematuria, dan piuria. Terjadinya gangguan ginjal berhubungan dengan *Escherichia coli* nefropatogenik yang memproduksi hemolisin, dan antigen K. Sedangkan pielonefritis berhubungan dengan adanya fimbria-P (Dzen dkk., 2003).

2. Diare

Diare adalah penyakit yang sering ditimbulkan oleh *Escherichia coli*. Diare didefinisikan sebagai buang air besar dengan feses yang tidak berbentuk atau cair dengan frekuensi lebih dari 3 kali dalam 24 jam (Zein, 2004). Secara garis besar ada 5 kelompok dari *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan diare dengan gambaran klinisnya masing-masing. Berikut adalah kelompok-kelompok *Escherichia coli* yang berperan dalam diare:

a. *Escherichia coli* Enteropatogenik (EPEC)

Penyebab penting diare pada bayi, khususnya di negara berkembang. EPEC melekat pada sel mukosa yang kecil. Faktor yang diperantarai secara kromosom menimbulkan pelekatan yang kuat. Akibat dari infeksi EPEC adalah diare cair yang biasanya sembuh sendiri tetapi dapat juga kronik. Lamanya diare EPEC dapat diperpendek dengan pemberian antibiotik. Diare terjadi pada manusia, kelinci, anjing, kucing dan kuda. Seperti ETEC, EPEC juga menyebabkan diare tetapi mekanisme molekular dari kolonisasi dan etiologi adalah berbeda. EPEC sedikit fimbria, ST dan LT toksin, tetapi EPEC menggunakan adhesin yang dikenal sebagai intimin untuk mengikat inang sel usus. Sel EPEC invasive (jika memasuki sel inang) dan menyebabkan radang.

b. *Escherichia coli* Enterotoksigenik (ETEC)

Penyebab yang sering dari “diare wisatawan” dan sangat penting menyebabkan diare pada bayi di negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil. Lumen usus terengang oleh cairan dan mengakibatkan hipermotilitas serta diare, dan berlangsung selama beberapa hari. Beberapa strain ETEC menghasilkan eksotosin tidak tahan panas. Profilaksis antibakteri dapat efektif

tetapi bisa menimbulkan peningkatan resistensi antibiotic pada bakteri, mungkin sebaiknya tidak dianjurkan secara umum. Ketika timbul diare, pemberian antibiotic dapat secara efektif mempersingkat lamanya penyakit. Diare tanpa disertai demam ini terjadi pada manusia, babi, domba, kambing, kuda, anjing, dan sapi. ETEC menggunakan fimbrial adhesi (penonjolan dari dinding sel bakteri) untuk mengikat sel – sel enterosit di usus halus. ETEC dapat memproduksi 2 proteinous enterotoksin: dua protein yang lebih besar, LT enterotoksin sama pada struktur dan fungsi toksin kolera hanya lebih kecil, ST enterotoksin menyebabkan akumulasi cGMP pada sel target dan elektrolit dan cairan sekresi berikutnya ke lumen usus. ETEC strains tidak invasive dan tidak tinggal pada lumen usus.

c. *Escherichia coli* Enterohemoragik (EHEC)

Menghasilkan verotoksin, dinamai sesuai efek sitotoksinya pada sel Vero, suatu sel hijau dari monyet hijau Afrika. Terdapat sedikitnya dua bentuk antigenic dari toksin. EHEC berhubungan dengan holitis hemoragik, bentuk diare yang berat dan dengan sindroma uremia hemolitik, suatu penyakit akibat gagal ginjal akut, anemia hemolitik mikroangiopatik, dan trombositopenia. Banyak kasus EHEC dapat dicegah dengan memasak daging sampai matang. Diare ini ditemukan pada manusia, sapi, dan kambing.

d. *Escherichia coli* Enteroinvasif (EIEC)

Menyebabkan penyakit yang sangat mirip dengan shigellosis. Penyakit terjadi sangat mirip dengan shigellosis. Penyakit sering terjadi pada anak – anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju ke negara tersebut. EIEC melakukan fermentasi laktosa dengan lambat dan tidak bergerak. EIEC

menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus. Diare ini ditemukan hanya pada manusia.

e. *Escherichia coli* Enteroagregatif (EAEC)

Menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di negara berkembang. Bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatnya pada sel manusia. EAEC memproduksi hemolisin dan ST enterotoksin yang sama dengan ETEC (Triatmodjo, 1992).

3. Sepsis

Terjadi bila pertahanan hospes tidak adekuat, *Escherichia coli* kemudian bisa masuk peredaran darah dan menyebabkan sepsis. Bayi-bayi yang baru lahir sangat peka terhadap sepsis akibat *Escherichia coli* karena mereka tidak memiliki antibody IgM. Sepsis juga bisa terjadi sebagai efek sekunder dari ISK (Dzen dkk., 2003)

4. Meningitis

Escherichia coli merupakan penyebab utama meningitis pada bayi, disamping *Streptococcus* grup B. Hampir 75% *Escherichia coli* dari kasus meningitis memiliki antigen K1. Antigen ini bisa bereaksi silang dengan polisakarida kapsuler grup B dari *Neisseria meningitidis* (Dzen dkk., 2003)

2.2. Tanaman Lada Hitam

2.2.1 Asal Usul Lada Hitam

Menurut sejarah dan literatur yang ada, tanaman lada bukan tanaman asli Indonesia, melainkan India. Keberadaan tanaman lada sudah dikenal secara luas di India pada tahun 100-400M, ditemukan tumbuh secara liar di hutan-hutan belukar di sekitar Malabar sampai daerah Ghat Barat.

Sejalan dengan perkembangan tentang pengetahuan mengenai komposisi kimia lada dan manfaatnya, tanaman ini semakin berkembang ke luar India. Negara-negara yang saat ini mengembangkan tanaman lada antara lain Brazil, Madagaskar, Serawak, Sri Lanka, Malaysia, Nigeria, Thailand dan Indonesia.

Tanaman lada masuk ke Indonesia pada abad XVI (sekitar tahun 1547). Konon bibit tanaman ini mula-mula dibawa oleh koloni Hindu yang kemudian membuat lokasi kebun di daerah Cirebon. Cirebon merupakan lokasi yang strategis karena memiliki dermaga yang dapat dimasuki kapal-kapal asing dari luar negeri. Pada masa penjajahan daerah ini menjadi sentrum produksi lada. Dari Cirebon, tanaman lada menyebar ke berbagai daerah lain di Indonesia, misalnya Sumatra, Kalimantan, Sulawesi dan pulau-pulau lainnya termasuk Bangka Belitung.

Pada abad XIX (sekitar tahun 1874), Indonesia sudah mengembangkan usaha tani lada hitam dalam skala besar, dengan pusat produksi di Lampung, Bangka dan Belitung. Hingga saat ini, sentrum produksi lada di daerah itu terdapat di ketiga daerah tersebut. Bangka dan Belitung terkenal dengan produksi lada putih, sedangkan Lampung terkenal dengan produksi lada hitam (Sarpian, 2007).

2.2.2 Morfologi dan Identifikasi Tanaman Biji Lada Hitam

Sebagai tanaman yang berasal dari hutan-hutan yang lembab di wilayah tropis, lada menghendaki tempat tumbuh dengan kelembapan tinggi, terutama pada periode pembungaan. Karenanya, lada paling cocok ditanam di daerah dengan curah hujan minimum 2.200-3.000 mm/tahun. Daerah dengan curah

hujan seperti itu umumnya ada di wilayah Indonesia, antara lain Jawa, Sumatra, Sulawesi, Kalimantan hingga Papua. Sehubungan dengan syarat curah hujan tersebut, lada tidak cocok dibudidayakan di Nusa Tenggara yang curah hujannya sangat rendah (Sutarno dan Sandoko, 2005).

Tanaman lada memiliki batang yang tumbuh merambat pada tiang panjat dan kadang menjalar di atas permukaan tanah. Bila dibiarkan, panjang batang dapat mencapai 15 m atau lebih. Dalam budidaya tanaman lada, batang dipotong hingga memiliki ukuran panjang berkisar antara 275-300 cm. Pada umumnya, dari satu bibit yang ditanam, baik bibit yang berasal dari perkembangan generatif atau vegetatif hanya akan tumbuh satu batang lada. Jika batang dipotong setelah berumur satu tahun, akan tumbuh 2-5 batang lada baru dari ruas batang yang berada di dalam tanah maupun di atas permukaan tanah. Batang tanaman lada beruas-ruas seperti batang tanaman tebu atau tanaman akar-akaran. Panjang antara ruas yang satu dengan ruas berikutnya tidak sama, tergantung pada kecepatan pertumbuhan tanaman tersebut. Pada umumnya panjang ruas batang lada berkisar antara 4-7cm. Ruas pada pangkal lebih pendek dibandingkan dengan ruas pada pertengahan dan ujung batang. Ukuran batang juga tidak sama, rata-rata berdiameter antara 6-25 mm (Sarpian,2007).



Gambar 2.5 Tanaman Lada (Rangga Cesar's Agriculture,2010).

Akar tanaman lada berbentuk akar tunggang yang mirip dengan akar serabut yang berukuran kecil-kecil dan tidak panjang sebagaimana lazimnya akar tunggang. Menurut jenisnya, akar lada hitam dibedakan menjadi dua macam yaitu akar lekat yang tumbuh di atas permukaan tanah dan akar tanah yang berada di dalam tanah (Sarpian, 2007).

Daun tanaman lada bertangkai pendek, berdaun tunggal, berwarna hijau dan berbentuk bulat telur dengan pucuk meruncing, memiliki panjang 12-18 cm dan lebar 5-10 cm serta beurat daun 5-9. Terdapat perbedaan warna daun di permukaan atas dan bawah yaitu di permukaan atas daun berwarna hijau mengkilap sedangkan di permukaan bawah daun berwarna hijau pucat dan buram. Daun tumbuh pada batang, cabang dan dahan, berselang-seling satu ke kiri dan satu ke kanan. Setiap ruas hanya ditumbuhi oleh sehelai daun. (Sarpian, 2007).

Bunga lada terdiri atas beberapa bagian yang merupakan satu kesatuan yang tidak dapat dipisahkan yaitu tajuk, mahkota, benang sari dan putik. Bentuk dan ukuran bagian-bagian bunga tersebut sangat kecil sehingga sulit dilihat dengan mata telanjang. Untuk membedakannya dapat digunakan mikroskop (Sarpian, 2007).

Secara umum, buah lada berbentuk bulat seperti bola. Buah yang masih muda memiliki kulit luar berwarna hijau mengkilap dan setelah masak berubah menjadi kuning dan merah menyala. Buah lada terdiri atas beberapa lapisan, dari luar ke dalam berturut-turut adalah sebagai berikut kulit luar, kulit dalam, kulit ari luar, kulit ari dalam dan daging buah. Untuk mendapatkan lada hitam, buah lada dijemur hingga kering tanpa mengupas kulit luarnya (Sarpian, 2007)



Gambar 2.6 Daun dan Biji Lada (Rangga Cesar's Agriculture,2010).

2.2.3 Taksonomi Lada Hitam

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Mangnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Magnolidae
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: <i>Piper</i>
Spesies	: <i>Piper nigrum</i> L

2.2.4 Kandungan Lada Hitam

Biji lada hitam mengandung berbagai senyawa kimia seperti *flavonoida*, *saponin*, *piperine*, minyak atsiri, kavisin dan sebagainya (Muhsin,2009).

2.2.4.1. *Flavonoid*

Flavonoid merupakan substansi fenolik yang berwarna dan ditemukan pada banyak tumbuhan tingkat tinggi. Lebih dari 3000 macam *flavonoid* telah diisolasi dari ekstrak berbagai tumbuhan. *Flavonoid* merupakan sumber utama pigmen merah, biru, dan kuning pada bunga dan buah, kecuali karotenoid. Konsentrasi flavonoid tertinggi terdapat pada jaringan luar yang berwarna seperti kulit buah. Kebanyakan *flavonoid* memiliki struktur dasar 1,4-benzopyrone. *Flavonoid* dibagi menjadi 12 sub grup sesuai struktur kimianya, yaitu: flavines, falvonols, flavanonols, isoflavones, anthocyanins, anthocyanidins, leucoanthosyanins, chalcones, dihydrochalcones, aurones, dan catechins

(Machlin, 1991).

Flavonoid bisa diekstraksi dengan menggunakan pelarut air, methanol dan etanol (Darusman, 2007). *Flavonoid* mempunyai macam efek, yaitu efek anti tumor, anti HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), immunostimulant, antioksidan, analgesik, antiinflamasi, antivirus, antifungal, antidiare, antihepatotoksik, antihiperlipidemik, dan sebagai vasodilator (de Padua *et al*, 1999).

Mekanisme *flavonoid* sebagai antioksidan dapat dibedakan menjadi dua cara berdasarkan perbedaan kimiawinya, yaitu (Berg *et al*, 1992):

1. Mencegah pembentukan radikal bebas, dengan jalan:
 - Sebagai agen pengikat ion metal (*chelator*)
 - Mereduksi hidroperoksida menjadi hidroksida yang kurang reaktif
2. Sebagai pemungut radikal bebas, melalui:
 - Pembentukan “anti oksidan radikal” yang kurang reaktif dengan cara dismutase, rekordinasi atau reduksi
 - Mengkatalisis perubahan bentuk menjadi non radikal (seperti reaksi SOD)

Efek *flavonoid* sebagai anti mikroba diduga karena kemampuannya berikatan dengan protein ekstraseluler dan membran sitoplasma dari kuman. Semakin lipofilik suatu *flavonoid*, maka semakin kuat daya rusak *flavonoid* tersebut terhadap membran sitoplasma kuman (Tsuchiya *et al.*, 1996).

2.2.4.2. Saponin

Saponin adalah senyawa yang bersifat larut air. Senyawa ini terdiri dari kombinasi antara hidrofobik triterpene dengan glukosa hidrofilik sehingga mempunyai kemampuan sebagai deterjen. Sifat ini dapat merusak membran sel bakteri secara utuh (Tsuchiya *et al.*, 1996).

Saponin berperan dalam proses perusakan membran sel kuman dengan cara berikatan dengan kompleks polisakarida pada dinding sel (Tsuchiya *et al.*, 1996).

Sifat-sifat *saponin* adalah:

- 1) Mempunyai rasa pahit
- 2) Dalam larutan air membentuk busa yang stabil
- 3) Menghemolisa eritrosit
- 4) Merupakan racun kuat untuk ikan dan amfibi
- 5) Membentuk persenyawaan dengan kolesterol dan hidrokortikosteroid lainnya
- 6) Sulit untuk dimurnikan dan diidentifikasi
- 7) Berat molekul relatif tinggi, dan analisis hanya menghasilkan formula empiris yang mendekati.

Berdasarkan atas sifat kimiawinya, *saponin* dapat dibagi dalam dua kelompok:

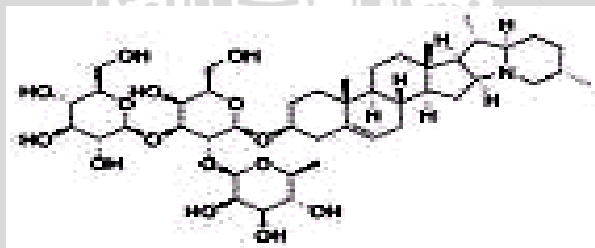
- 1) Steroids dengan 27 atom C

2) Triterpenoids, dengan 30 atom C. Macam-macam *saponin* berbeda sekali komposisi kimiawinya, yaitu berbeda pada aglikon (*sapogenin*) dan juga karbohidratnya, sehingga tumbuh-tumbuhan tertentu dapat mempunyai macam-macam *saponin* yang berlainan, seperti (Tsuchiya *et al.*, 1996):

- *Quillage saponin* : campuran dari 3 atau 4 *saponin*
- *Alfalfa saponin* : campuran dari paling sedikit 5 *saponin*
- *Soy bean saponin* : terdiri dari 5 fraksi yang berbeda dalam *sapogenin*, atau karbohidratnya, atau dalam kedua-duanya.

Ikan yang mati karena racun *saponin*, tidak toksik untuk manusia bila dimakan. Tidak toksiknya untuk manusia dapat diketahui dari minuman seperti bir yang busanya disebabkan oleh *saponin* (Nio, 1989).

Senyawa *saponin* dapat bekerja sebagai antibakteri. Senyawa ini akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel bakteri (Arsyi, 2008).



Gambar 2.7 Struktur Kimia *Saponin* (Puregreen, 2008)

2.2.4.3. *Piperine*

Piperine ditemukan sebagai bahan aktif dan merupakan alkaloid yang bertanggung jawab terhadap rasa pedas serta bau lada hitam. Konsentrasi

piperine dalam lada hitam sekitar 5-9%. *Piperine* juga digunakan dalam pengobatan tradisional dan sebagai insektisida. *Piperine* merupakan senyawa amida basa lemah yang dapat membentuk garam dengan asam mineral kuat. *Piperine* dapat dihidrolisis dengan KOH –etanolik yang akan menghasilkan kalium piperinat dan piperidin. Oleh karena itu pada proses isolasi, pemberian KOH-etanolik tidak boleh berlebihan dan harus dalam keadaan panas (Amalina, 2008).

2.2.5 Pemakaian Dalam Pengobatan

Biji lada hitam diketahui bersifat antibakteri. Biji lada hitam dapat digunakan untuk berbagai macam pengobatan, antara lain untuk melancarkan menstruasi, meredakan serangan asma, meringankan gejala reumatik, mengatasi perut kembung, serta menyembuhkan rasa sakit kepala. Dan karena khasiat inilah, lada hitam sering digunakan sebagai bahan ramuan atau campuran suplemen herbal (Waroengsehat, 2011).

Penelitian mengenai manfaat lada hitam sebagai antimikroba juga telah dilakukan oleh Sutedja dan Agustina. Dalam penelitian yang menggunakan metode cakram tersebut terbukti bahwa lada hitam mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* (Sutedja dan Agustina, 1991).

2.3 Cara Kerja Antimikroba

2.3.1 Menghambat Sintesis Dinding Sel

Dinding sel bakteri berfungsi sebagai pelindung osmotik protoplasma di

bawahnya dari trauma baik osmotik maupun mekanik. Tekanan osmotik tinggi di dalam sel akan mendorong cairan dari dalam sel bakteri sehingga terjadi kebocoran dan kematian sel kuman. Hal ini menjadi dasar efek bakterisidal pada bakteri. Contoh antimikroba jenis ini adalah β -laktam (penisilin dan cephalosporin) (Cowman, 1999).

2.3.2 Menghambat Fungsi Membran Sel

Membran sel merupakan pembatas membran bagi bebasnya difusi antara lingkungan dalam dan luar sel. Gangguan dalam keutuhan membran sel tersebut dapat menyebabkan terjadinya kebocoran dan kematian sel, mempengaruhi konsentrasi metabolit dan bahan gizi dalam sel, menghambat proses pernafasan dan aktivitas biosinteti tertentu yang secara keseluruhan mempengaruhi kehidupan sel bakteri itu sendiri. Contohnya antimikroba jenis ini adalah polimiksin yang berikatan dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri sehingga merusak struktur membran sel tersebut (Cowman, 1999).

2.3.3 Menghambat Sintesa Protein

Sintesa protein merupakan hasil dari 2 proses utama yaitu transkripsi dan translasi. Sintesa ini terjadi pada ribosom. Streptomisin dapat berikatan dengan ribosom 30S sehingga menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA dan terbentuk protein abnormal dan non fungsional bagi sel bakteri (Cowman, 1999).

2.3.4 Menghambat Sintesa Asam Nukleat

Sintesa asam nukleat erat kaitannya dengan proses duplikasi dan transkripsi. Setiap zat yang mengganggu sintesa ini akan mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan dan metabolisme sel bakteri. Rifampisin dapat berkaitan dengan enzim Polymerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Cowman, 1999).

2.3.5 Menghambat Metabolisme Sel Bakteri

Enzim-enzim yang berperan dalam proses metabolisme seringkali dihambat oleh senyawa-senyawa yang mempunyai struktur mirip dengan substrat asalnya. Senyawa ini bergabung dengan enzim tersebut sehingga mencegah kombinasi substrat-enzim dan reaksi-reaksi katalitik. Sulfonamid berkompetisi dengan PABA (*Para-AminoBenzoic Acid*) untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat sehingga terbentuk analog asam folat yang non fungsional. Akibatnya kelangsungan hidup bakteri terganggu (Cowman, 1999).

2.4 Uji Kepekaan Antimikroba

2.4.1 Metode Dilusi Tabung

Cara ini digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) dari obat antimikroba. Prinsip metode ini adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. 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 dari obat. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji (Dzen dkk., 2003).

2.4.2 Metode Difusi Cakram

Prinsip dari metode difusi cakram adalah sebagai berikut. Obat ditunjukkan 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 area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba (Dzen dkk., 2003).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolate mikroba sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dua cara sebagai berikut ini (Dzen dkk., 2003).

- Cara Kirby Bauer, yaitu dengan cara membandingkan diameter dari area jernih (zona hambat) disekitar cakram dengan tabel standart yang dibuat oleh NCCLS (National *Comitte for Clinical Laboratory Standart*). Dengan table NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediate dan resisten.
- Cara Joan-Stokes, yaitu dengan cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji.

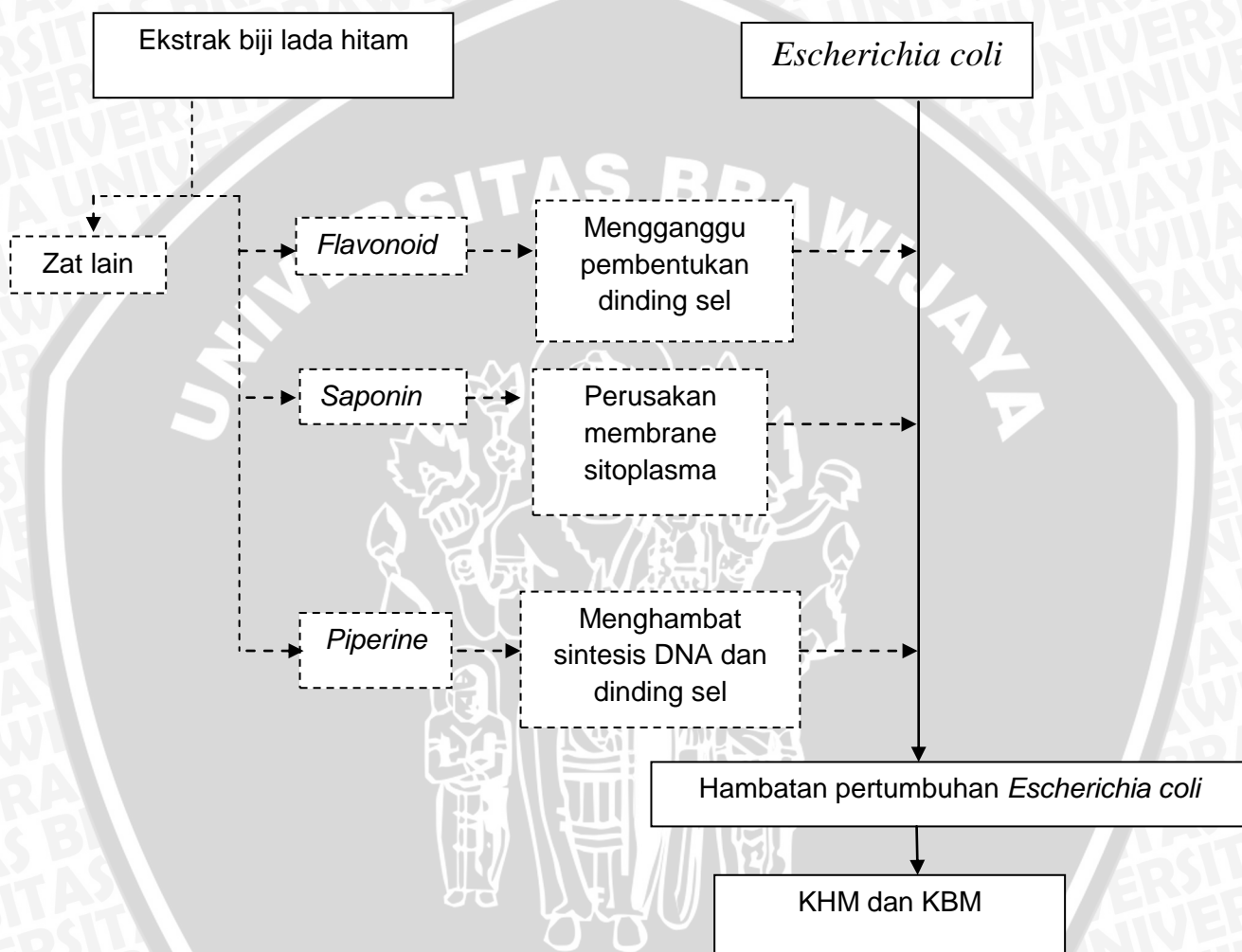
Pada cara Joan-Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar.



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka konsep



Gambar 3.1. Skema kerangka konsep penelitian

Keterangan:

—————▶ : alur kerja yang diteliti

▭ : diteliti

- - - - -▶ : alur kerja yang tidak diteliti

- - - - -▭ : tidak diteliti

Escherichia coli adalah bakteri yang dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti infeksi saluran kemih, diare, sepsis, dan meningitis. Saat ini penyakit-penyakit tersebut mulai sering dijumpai. Hal ini disebabkan oleh mudahnya penularan infeksi bakteri dari penderita ke orang lain, bahkan dapat terjadi di pusat layanan kesehatan.

Khasiat dan kandungan senyawa-senyawa yang terdapat dalam biji lada hitam antara lain adalah sebagai antioksidan, asam askorbat, sitotoksik, dan antibakteri. Biji lada hitam sendiri mengandung beberapa senyawa aktif biologi seperti *flavonoid*, *saponin*, *piperine*, dan minyak atsiri.

Aktivitas *flavonoid* merupakan suatu zat aktif yang memiliki efek anti mikroba. Mekanisme *flavonoid* berkaitan dengan kemampuan membentuk kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga menyebabkan kerusakan pada membrane sitoplasma dan terjadi gangguan pada dinding bakteri dan bakteri lisis. *Saponin* bersifat merusak membrane sel bakteri secara utuh, berperan dalam proses perusakan membrane sel bakteri dengan cara berikatan dengan kompleks polisakarida pada dinding sel. Sedangkan *piperine* memiliki efek yang hampir sama dengan *flavonoid*, yaitu mengganggu proses pembentukan dinding sel bakteri, selain itu *piperine* dapat pula mengganggu sintesis DNA dari bakteri.

3.2. Hipotesis Penelitian

Ekstrak biji lada hitam (*Piper nigrum*) efektif sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Uji antimikroba dengan menggunakan *tube dilution test* untuk mengetahui aktivitas ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) sebagai antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Proses pengekstrakan lada hitam menggunakan metode maserasi dengan pelarut ethanol. Sedangkan pengujian ekstrak lada hitam sebagai antimikroba menggunakan metode dilusi tabung. *Tube dilution test* meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* dan tahap penanaman pada medium NAP (*Nutrient Agar Plate*) dengan metode *streaking* (penggoresan) yang bertujuan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum). Besarnya konsentrasi yang digunakan, ditetapkan melalui eksperimen pendahuluan.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan April - Juni 2012.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak lada hitam dan menggunakan bakteri uji *Escherichia coli* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Pada penelitian ini, digunakan 6 macam dosis konsentrasi perlakuan berbeda serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sbb (Loekito, 1998) :

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5 \rightarrow 4$$

jadi besarnya pengulangan yang dilakukan adalah 4 kali

keterangan : n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (konsentrasi ekstrak lada hitam)

4.4 Variable Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak lada hitam yang dibuat dengan konsentrasi kadar ekstrak antara lain : 0% , 22,5% , 25% , 27,5%, 30%, dan 32,5% berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat kekeruhan yang dapat diamati pada tabung dan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh pada medium NAP.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Isolat bakteri *Escherichia coli* yang digunakan adalah bakteri dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang berasal dari darah penderita di Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang.

4.5.2 Ekstrak lada hitam yang digunakan adalah lada hitam yang dibeli dari toko di Pasar Belimbing Malang dan melalui proses ekstraksi di Poltek Malang.

4.5.3 Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi Minimum larutan ekstrak lada hitam yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada larutan yang berisi ekstrak lada hitam dan suspensi bakteri tersebut dalam tabung setelah diinkubasikan 18-24 jam (Finegold *et al.*, 1986). Definisi ini tidak berlaku jika ada reaksi antara bahan aktif ekstrak dengan media *Nutrient Broth* yang menyebabkan kekeruhan pada seluruh tabung.

4.5.4 Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi Minimum ekstrak lada hitam yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni pada medium NAP setelah diinkubasikan selama 18-24 jam yang dibandingkan dengan control negatif.

4.5.5 Kontrol positif/kontrol bakteri adalah konsentrasi 0 % yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri

lain. Kontrol positif berasal dari larutan bakteri uji yang telah distandardisasi dengan standar *Mc Farland* 0,5 sebanyak 2 ml.

4.5.6 Kontrol negatif/kontrol bahan adalah konsentrasi yang digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril. Kontrol negatif dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak lada hitam sebanyak 1 ml dengan aquades sebanyak 1 ml.

4.5.7 *Original inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Ekstrak Lada Hitam:

- Oven
- Timbangan
- Gelas Erlenmeyer (2)
- Corong gelas (1)
- Kertas saring (1)
- Labu evaporator (1)
- Labu penampung *ethanol* (1)
- Pendingin spiral/*rotator evaporator* (1)
- Selang water pump (1)
- Water pump
- Water bath
- Vacuum pump

- Lada Hitam
- Aquades
- *Ethanol 96%*

4.6.2 Alat dan Bahan Untuk Pewarnaan Gram Bakteri :

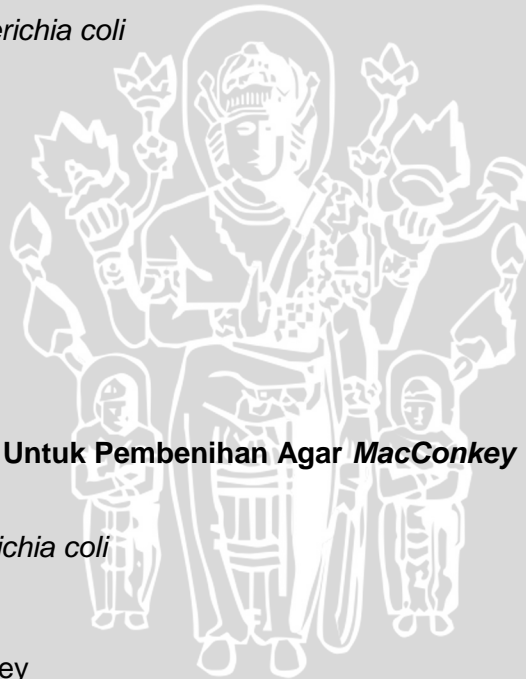
- Gelas objek
- Kertas penghisap
- Mikroskop
- Bakteri *Escherichia coli*
- Lugol
- Kristal violet
- Alkohol 96%
- Saffarin
- Air

4.6.3 Alat dan Bahan Untuk Pembenihan Agar *MacConkey*

- Bakteri *Escherichia coli*
- *Selenite broth*
- Agar *MacConkey*
- Ose

4.6.4 Alat dan Bahan Untuk Pembenihan Agar EMB (*Eosin Methylin Blue*)

- Bakteri *Escherichia coli*
- *Selenite broth*
- Agar EMB
- Ose



4.6.5 Alat dan Bahan Untuk TSI (*Triple Sugar Iron*)

- Koloni *Escherichia coli* dari biakan *MacConkey*
- Agar TSI
- Ose

4.6.6 Alat dan Bahan Untuk Uji Dilusi Tabung :

- Tabung reaksi
- Pipet steril ukuran 1 ml
- Karet penghisap
- Inkubator
- Ekstrak lada hitam
- Vortex
- Pembenuhan cairan yang distandarisasikan (*NaCl, broth*)
- NAP (*Nutrient Agar Plate*)
- Bunsen (lampu spritus)
- Korek api
- Gelas objek
- Plate kosong dan steril
- Kapas
- Alat penjepit (*scalpel*) steril
- *Colony counter*

4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Lada Hitam

- 1) Lada hitam dikeringkan kemudian dihaluskan dengan blender dan timbang sebanyak 100 gram (sample kering). Ini bertujuan agar senyawa aktif yang terkandung dalam lada hitam dapat larut dalam *ethanol* 96%.
- 2) Masukkan 100 gram hasil blenderan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter lalu rendam dengan hasil *ethanol* 96% sampai volume 1000cc
- 3) Kocok sampai benar-benar tercampur kurang lebih 30 menit dan diamkan 1 malam sampai mengendap
- 4) Setelah itu, lapisan paling atas dari larutan campuran *ethanol* 96% dan lada hitam diambil dan diletakkan dalam gelas ekstraksi kemudian di evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*.
- 5) Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40° terhadap meja percobaan, dengan susunan dari bawah ke atas : Alat pemanas air, labu penampung hasil, *rotatory evaporator*, dan tabung pendingin.
- 6) Tabung pendingin dihubungkan dengan alat pompa sirkulasi air dingin dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik, tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.
- 7) Labu penampung hasil evaporasi diisi dengan hasil ekstraksi, kemudian dirangkai kembali.
- 8) *Rotatory evapotaror*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
- 9) Pemanas aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut *ethanol* mulai menguap.

10) Hasil penguapan *ethanol* akan dikondensasikan menuju labu penampung *ethanol* sehingga tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap lain tersedot pompa vakum.

11) Setelah kental maka proses evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.

12) Setelah evaporasi selesai, ekstrak dioven kembali dengan suhu 78°C selama 2 jam karena titik didih *ethanol* adalah 78°C. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa *ethanol* 96% yang mungkin masih tersisa dalam ekstrak

Etanol 96% dipilih karena efek anti mikroba yang didapat bukan berasal dari etanol, hal ini disebabkan ekstrak telah mengalami proses evaporasi dan oven pada suhu 80° celcius sedangkan titik didih etanol 78° celcius sehingga diperkirakan etanol sudah menguap (Siswandono, 1995). Sehingga zat antimikroba yang dihasilkan pada ekstrak murni berasal dari lada hitam.

4.7.2 Identifikasi Ulang Bakteri *Escherichia coli*

Sebelum digunakan untuk penelitian, isolat *Escherichia coli* yang diperoleh diidentifikasi ulang dengan beberapa metode identifikasi antara lain: perwarnaan Gram (didapatkan bentuk Gram negatif), *Triple Sugar Iron* (TSI), Tes Biokimia (IMVIC MU) , Tes Urease, Pembenihan Agar Pada *MacConkey* dan Pembenihan Pada EMB (*Eosin Methylin Blue*).

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

1. Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak. Kemudian biarkan dingin

2. Buat sediaan bakteri diatas gelas obyek dengan ketebalan yang cukup (tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis) dan dibiarkan kering diudara. Kemudian difiksasi diatas lampu bunsen.
3. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
4. Kemudian sediaan dituangi dengan Lugol. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan air.
5. Sediaan dituangi dengan alcohol 96%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
6. Sediaan dituangi dengan Safranin. Setelah setengah menit, sediaan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat dibawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x (Dzen dkk., 2003).

4.7.2.2 TRIPLE SUGAR IRON AGAR (TSI)

1. Satu koloni terpisah dari biakan *MacConkey* diambil dengan ose lurus kemudian ditanam dengan cara menusuk sampai dekat dengan dasar tabung kemudian menggoreskan ose tersebut secara zigzag pada permukaan agar TSI
2. Agar tersebut di inkubasi semalam pada suhu 37 °C

Tabel 4.1 Reaksi Pada Agar TSI terhadap bakteri *E.coli* (Dzen dkk., 2003)

NO	HASIL REAKSI	PENULISAN	PENJELASAN
1	<i>Siant</i> : Alkali (Merah)	Alk/As	Fermentasi glukosa

2	<p><i>Butt</i>: Asam (Kuning)</p> <p><i>Siant</i>: Asam (kuning)</p> <p><i>Butt</i>: Asam (Kuning)</p>	As/As	Fermentasi Laktosa dan fruktosa
3	<p><i>Siant</i>: Alkali (Merah)</p> <p><i>Butt</i>: Alkali (Merah)</p>	Alk/Alk	Tidak terjadi fermentasi
4	<p>Hitam pada <i>Butt</i></p> <p>Media pecah atau tampak</p>	H ₂ S+/-	Produksi H ₂ S
5	<p>gelembung gas</p>	Gas +/-	Produksi Gas

4.7.2.3 Tes Biokimia (IMVIC MU)

Indole

1. Inokulasi *Tryptophane* broth dengan 1 tetes dari 24 jam kultur broth.
2. Inkubasi pada 37° C pada suhu ruangan selama 48 jam.
3. Tambahkan 0,5 mL Kovac's reagen atau Ehrlich pada kultur broth.
4. Hasil positif jika terbentuk cincin merah pada permukaan *Broth* (Dzen dkk.,2003)

Tes *Methyl Red*

1. Media MR-VP di inokulasi dengan bakteri yang diperiksa
2. Media diinkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37° C
3. Media ditetesi 5 tetes indikator *Methyl red*

4. Hasil positif jika warna media berubah jadi merah karena bakteri uji membentuk asam (Dzen dkk., 2003)

Tes Voges Pro Skauer

1. Media MR-VP diinokulasi dengan bakteri yang diperiksa
2. Media diinkubasi 1 x 24 jam pada suhu 37°C
3. Media ditetesi Alfa-NAPHTOL dalam alcohol absolute (15 tetes+ KOH 10% 10 tetes)
4. Hasil positif jika warna media berubah menjadi merah kecoklatan dalam waktu 15-30 menit karena bakteri uji membentuk asetilmethylcarbinol. (Dzen dkk., 2003)

Tes Citrate

1. Media *Simon's citrate* diinokulasi dengan bakteri yang diperiksa menggunakan ose lurus dengan cara menggores garis lurus pada permukaan media
2. Media diinkubasi semalam pada suhu 37°C
3. Hasil positif jika media berubah menjadi warna biru-prussi karena bakteri menggunakan *citrate* sebagai satu-satunya sumber karbon. (Dzen dkk., 2003)

Tes Motilitas

1. Media semisolid diinokulasi dengan bakteri yang diperiksa dengan menggunakan ose lurus dengan cara menusuk media
2. Media diinkubasi semalam dengan suhu 37°C

3. Bakteri yang motil akan tumbuh menyebar diluar garis bekas tusukan, bakteri yang nonmotil hanya tumbuh pada garis bekas tusukan. (Dzen dkk., 2003)

Tes Urease

1. Media cair yang mengandung urea diinokulasi dengan bakteri yang diperiksa
2. Media diinkubasi semalam pada suhu 37°C
3. Hasil positif bila warna media berubah merah keunguan artinya bakteri uji dapat memecah urea menjadi ammonia sehingga suasana menjadi alkali. (Dzen dkk., 2003)

4.7.2.4 Pembenihan Agar Pada *MacConkey*

1. Spesimen di tanam pada *selenite broth* kemudian di inkubasi pada suhu 37 °C
2. Biakan pada *selenite broth* (1 ose) ditanam pada agar *MacConkey* untuk mendapatkan koloni terpisah kemudian di inkubasi sampai suhu 37 °C
3. Bila warna media menjadi merah artinya bakteri uji memfermentasi laktosa (Dzen dkk., 2003)

4.7.2.5 Pembenihan Pada EMB (*Eosin Methylin Blue*)

1. Biakan pada *selenite broth* (1 ose) ditanam pada agar EMB kemudian di inkubasi semalam pada suhu 37 derajat celcius.
2. Koloni *Escherichia coli* akan memberikan gambaran *metallic-sheen* pada agar EMB. (Dzen dkk., 2003)

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Preparasi Uji Bakteri

1. Ambil koloni *Escherichia coli* dengan karakteristik sama dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose.
2. Masukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi nutrient broth, kemudian inkubasikan tabung reaksi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density (OD)* dari suspense tersebut.
4. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10⁸/mL yang setara dengan OD=0,1, lakukan penghitungan sebagai berikut:

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

Keterangan:

N₁ = Hasil spektrofotometri

V₁ = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N₂ = OD (0,1 setara dengan 10⁸)

V₂ = Volume suspense bakteri uji (10mL)

5. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10⁸/mL sebanyak 10mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10⁶/mL. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.8.2 Pengujian Efek Antimikroba

Rangkaian uji aktivitas antibakteri ekstrak lada hitam adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak lada hitam disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap.
Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
2. Sediakan 7 tabung reaksi steril kemudian diberi label 0%, 22,5%, 25%, 27,5%, 30%, 32,5%, dan KB (kontrol bahan). Kontrol bahan adalah ekstrak. Konsentrasi ekstrak 0% adalah biakan bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml.
3. Tabung reaksi 1 diisi dengan 2 ml suspensi bakteri.
4. Tabung 2, 3, 4, 5, dan 6 diisi dengan aquades steril sebanyak 0,775 ml; 0,750 ml; 0,725 ml; 0,7 ml; dan 0,675 ml kemudian diisikan dengan ekstrak lada hitam sebanyak 0,225 ml; 0,250 ml; 0,275 ml; 0,3 ml; dan 0,325 ml.
5. Selanjutnya ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1ml pada tabung 2-7 sedangkan pada tabung 7 sebagai kontrol bahan ditambahkan 2ml ekstrak lada hitam.
6. Kontrol bakteri (0%) digoreskan pada NAP sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
7. Masing-masing tabung di-vortex dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
8. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung.

9. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada NAP. Kemudian diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C.

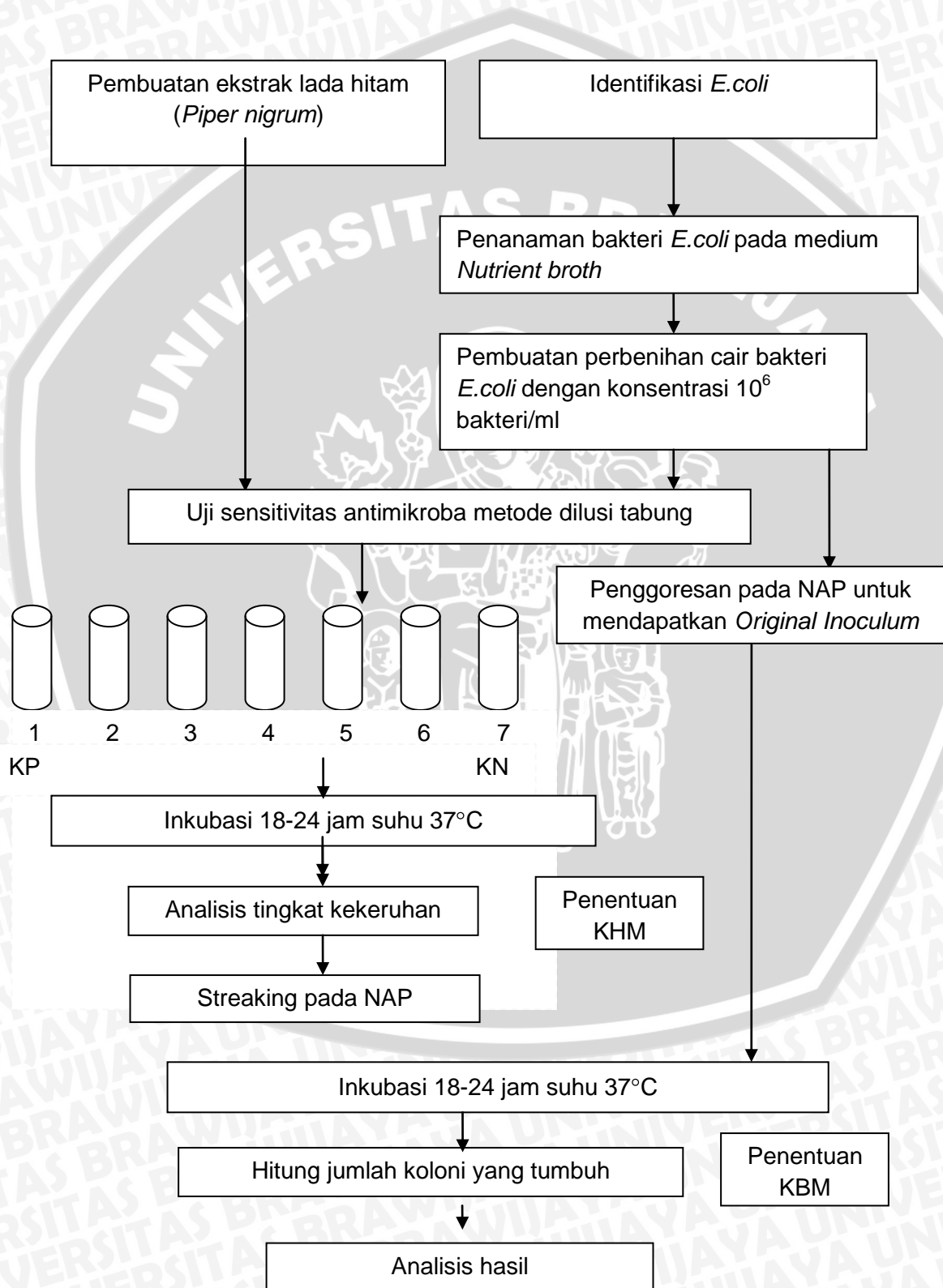
10. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI

4.9 Analisis Data

Analisis data menggunakan uji statistic *one way ANOVA*, pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Uji statistic ini digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan antara konsentrasi ekstrak lada hitam terhadap jumlah koloni bakteri *Escherichia coli*. Selain itu juga digunakan uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak lada hitam terhadap jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* (Lukito, 1998)

4.10 Alur Kerja Penelitian

Alur kerja penelitian dapat dilihat pada skema dibawah ini.



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Data Hasil Penelitian

5.1.1 Identifikasi bakteri *Esherichia coli*

Untuk memastikan kemurnian sampel bakteri yang digunakan pada uji efek ekstrak lada hitam sebagai antimiroba terhadap bakteri *E.coli*, maka diperlukan studi identifikasi keberadaan bakteri *E.coli* tersebut. Peneliti melakukan identifikasi menggunakan media agar Mc Conkey, agar EMB (*Eosin Methylene Blue*), tes agar TSI (*Triple Sugar Iron*), tes IMVIC MU (*Indole, Methyl red, Voges-proskauer, Citrate, Motility* dan *Urease*) dan pewarnaan Gram. Dari beberapa media tersebut, diperoleh pembiakan bakteri *E.coli* yang teridentifikasi dengan ciri-ciri penampakan yang berbeda. Melalui media *Mac Conkey*, bakteri *E.coli* tampak berwarna merah dan pada EMB berwarna mengkilat seperti logam, sedangkan pada tes TSI (*Triple Sugar Iron*) berwarna kuning, terdapat produksi gas, namun tidak terdapat pembentukan H_2S . Pada tes yang lain yaitu Tes IMVIC MU (*Indole, Methyl red, Voges-proskauer, Citrate, Motility* dan *Urease*) menunjukkan hasil Indole positif, *methyl red* positif, VP negatif, *citrate* negatif, motilitas positif, dan urease negatif. Sedangkan pada pewarnaan Gram didapatkan koloni berbentuk batang dan bersifat Gram Negatif. Untuk lebih jelasnya hasil berbagai uji identifikasi yang telah dilakukan dapat dilihat pada Tabel 5.1 dan Gambar 5.1

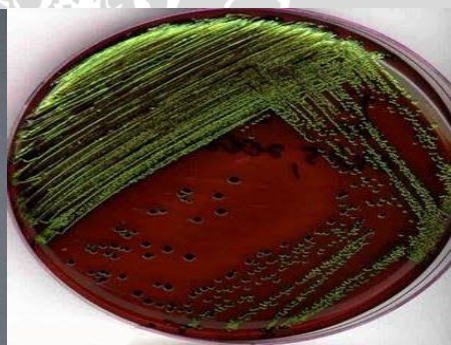
Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

Koloni pada <i>Mac Conkey</i>	Koloni pada EMB	Tes TSI (<i>Triple Sugar Iron</i>)	Tes IMVIC-MU	Pewarnaan Gram
Koloni berwarna merah (warna media menjadi merah)	Koloni mengkilat seperti logam	As/As Gas (+) H ₂ S (-)*	Indole (+) Methyl red (+) VP (-) Citrate (-) Motilitas (+) Urease (-)	Batang Gram negative

Tabel 5.1 Hasil Uji Identifikasi *Escherichia coli*



Koloni *E.coli* berwarna merah pada *Mac Conkey*



Koloni *E.coli* mengkilat seperti logam pada EMB



Koloni *E.coli* berwarna kuning, terdapat gelembung gas dan tidak terdapat pembentukan H_2S pada medium TSI

Hasil pengecatan Gram *E.coli* berwarna merah dan berbentuk batang

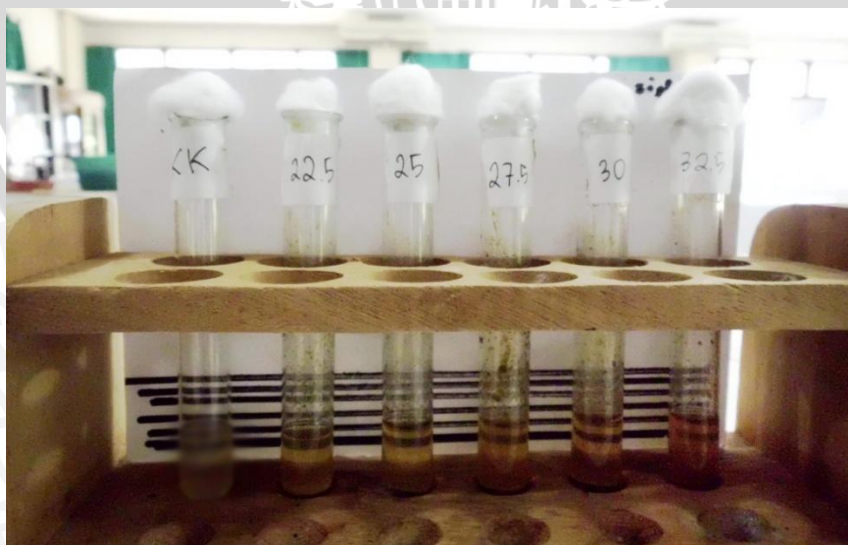
Gambar 5.1 Hasil Uji Identifikasi Bakteri *Escherichia Coli*

5.2 KHM dan KBM Berdasarkan Hasil Pengamatan dan Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri *Escherichia coli*

Peneliti melakukan penelitian eksplorasi terlebih dahulu sebelum mendapatkan konsentrasi perlakuan tersebut. Penelitian eksplorasi dilakukan dalam beberapa tahap. Eksplorasi awal adalah dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 0%. Dari eksplorasi tahap pertama tidak lagi didapatkan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 50% sehingga dilakukan penelitian eksplorasi berikutnya. Eksplorasi berikutnya dilakukan perapatan dosis hingga 6 kali. Hasil dari eksplorasi awal dan perapatan dosis yang telah dilakukan tersebut didapatkan konsentrasi ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*), dengan variasi konsentrasi 22,5% , 25% , 27,5% , 30% , 32,5% dan konsentrasi

0% (kontrol kuman) sebagai kontrol positif dan konsentrasi 100% sebagai kontrol negatif untuk menilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Kadar Hambat Minimum (KHM) dapat diamati dari tingkat kekeruhan pada dilusi tabung, sedangkan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dapat dinilai dengan melihat pertumbuhan koloni bakteri pada plate masing – masing konsentrasi.

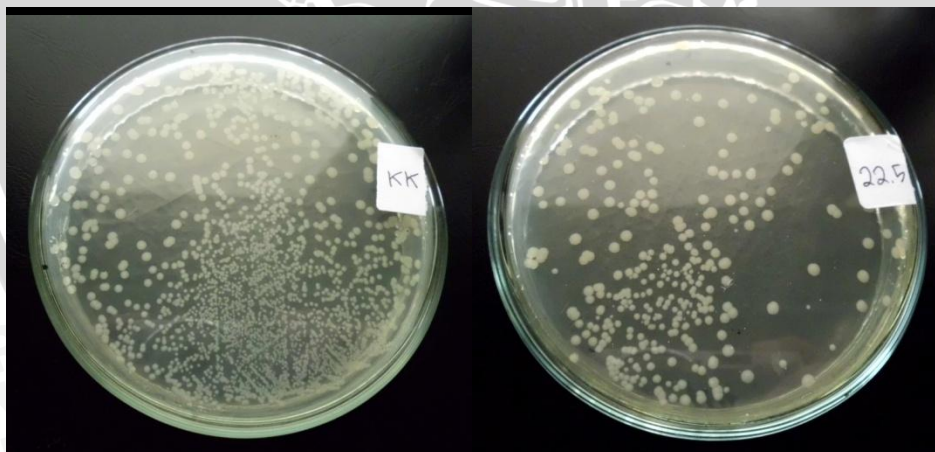
Nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak lada hitam terhadap bakteri *Escherichia coli* diamati dari tingkat kekeruhan pada dilusi tabung enam macam konsentrasi tersebut . Namun, sebelum diinkubasikan warna ekstrak lada hitam sudah terlihat sangat keruh sehingga pada penelitian ini tingkat kekeruhan bakteri pada masing-masing konsentrasi ekstrak tidak dapat diamati dan sekaligus tidak dapat di analisis secara kualitatif. Pada konsentrasi ekstrak paling rendah pun terlihat keruh, meskipun apabila dibandingkan dengan konsentrasi yang lain mempunyai tingkat kekeruhan yang berbeda-beda. Perbandingan tingkat kekeruhan pada masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 5.2 .

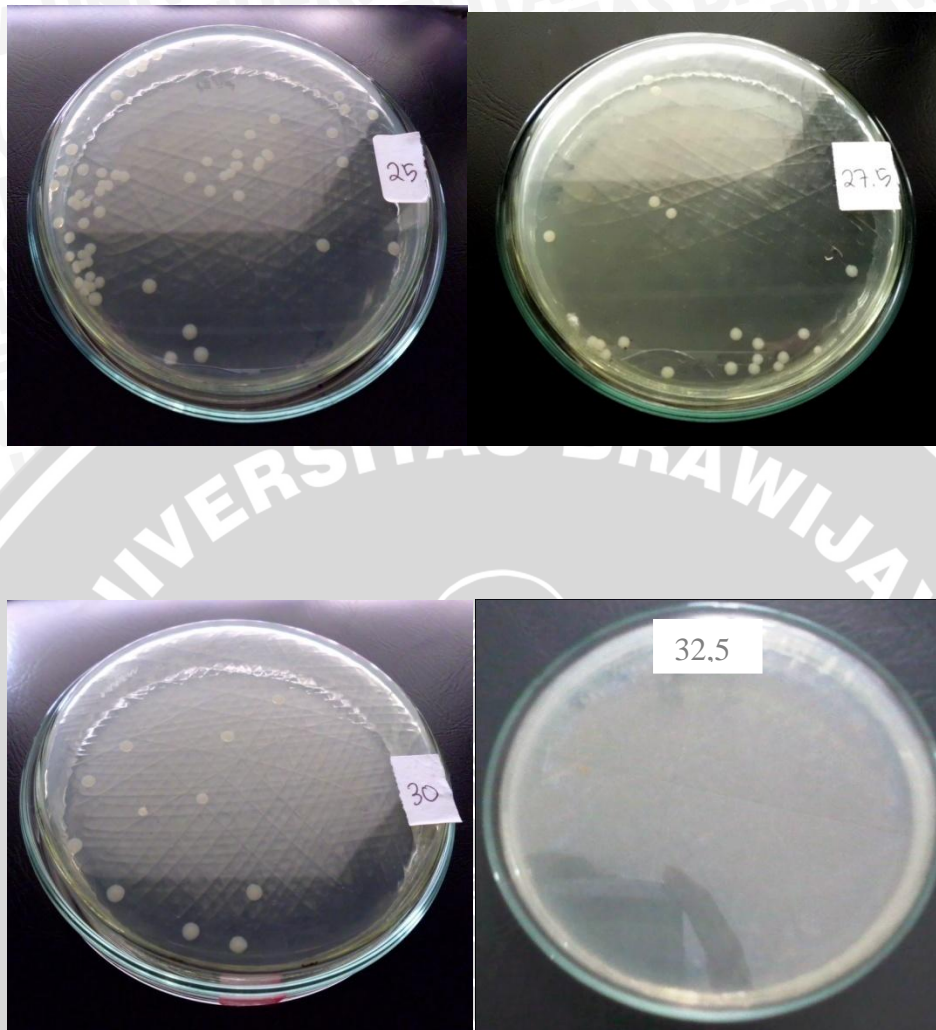


Gambar 5.2. Uji Dilusi Tabung Perbandingan Tingkat Kejernihan

Dari Gambar 5.2. dapat dilihat bahwa dari konsentrasi 22,5%-32,5% tidak tampak perbedaan warna yang signifikan dan cenderung sama. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh warna ekstrak yang sebelum diinkubasi berwarna keruh dan adanya faktor eksternal seperti suhu, tekanan osmosis, kadar oksigen dan kadar air. Akibat kekeruhan tersebut, maka Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak lada hitam terhadap bakteri *Escherichia coli* ini tidak dapat ditentukan secara kualitatif.

Kadar Bunuh Minimum (KBM) diperoleh berdasarkan pertumbuhan koloni bakteri pada plate masing-masing konsentrasi yang telah diinkubasi 18-24 jam sebelumnya. Hasil pengamatan dapat dilihat pada sampel Gambar 5.3. berikut





Gambar 5.3. Pertumbuhan koloni *Escherichia coli* pada Medium NAP
Terjadi penurunan jumlah bakteri *E.coli* yang tumbuh seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak lada hitam

Untuk mengetahui perbandingan pertumbuhan koloni pada masing-masing konsentrasi ekstrak dibutuhkan perhitungan dengan menggunakan *colony counter*. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut

KONSENTRASI	PENGULANGAN				JUMLAH KOLONI	RATA-RATA
	1	2	3	4		
0% (KP)	1301000	1838000	647000	1428000	6214000	1554000

22,5%	190000	180000	172000	240000	782000	196000
25%	64000	54000	48000	46000	212000	53000
27,5%	32000	39000	24000	21000	116000	29000
30%	14000	12000	16000	11000	53000	13000
32,5%	0	0	0	0	0	0
100 % (KN)	0	0	0	0	0	0
OI	267	236	220	273	996	249

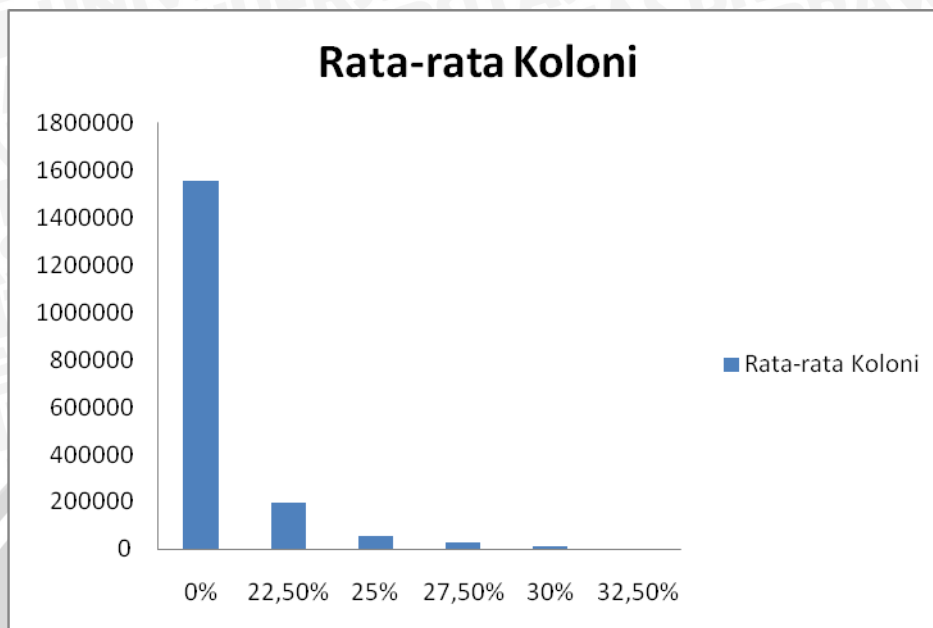
TABEL 5.2. Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *Escherichia coli* pada

Medium NAP

*Keterangan: jumlah koloni dalam satuan CFU/plate

Dari pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* tersebut dapat ditentukan Kadar Bunuh Minimum dari ekstrak lada hitam ini yaitu pada jumlah koloni $<0,1\%$ dari *original inoculum* pada pengulangan 1, pengulangan 2, pengulangan 3 dan pengulangan 4. Jumlah *original inoculum* bakteri *Escherichia coli* adalah 996 CFU/plate. Sehingga KBM nya adalah pada konsentrasi 32,5% ($0,1\%$ dari jumlah *original inoculums* = $0,996$ CFU/plate).

Adapun perbedaan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* yang dihasilkan pada media NAP secara keseluruhan pada setiap perlakuan di atas juga dapat digambarkan dalam bentuk grafik sebagai tampak pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Grafik rata-rata jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* dengan kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak lada hitam

Selanjutnya hasil penelitian akan dianalisis dengan ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan sensitivitas tiap variasi konsentrasi ekstrak lada hitam dan uji korelasi dan regresi untuk mengetahui lebih jauh mengenai pengaruh pemberian ekstrak lada hitam tersebut terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli*.

5.3 Analisis Data secara statistik

Sebelum dilakukan analisis data terhadap efek pemberian ekstrak lada hitam terhadap jumlah koloni bakteri *Escherichia coli*, diperlukan pemeriksaan terhadap jumlah koloni bakteri terlebih dahulu diuji untuk normalitas dan homogenitasnya sebagai uji prasyarat agar dapat dilakukan uji *One Way*

Anova. Berdasarkan hasil uji normalitas Kolmogorov Smirnov, distribusi data jumlah koloni bakteri adalah normal ($p = 0.102$) dan berdasarkan hasil uji homogenitas, data homogen ($p = 0.280$).

Uji *one way Anova* dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri setelah terpapar oleh ekstrak dengan berbagai konsentrasi. Dari uji *one way anova*, terdapat perbedaan yang bermakna atau signifikan jumlah koloni bakteri setelah terpapar oleh ekstrak pada berbagai konsentrasi ($p = 0.000$) atau dengan kata lain perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri

Selanjutnya dilakukan uji multi komparasi *Pos Hoc* untuk melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam dosis yang berbeda. Hasil yang didapat menunjukkan perbedaan jumlah koloni bakteri yang bermakna antara semua kelompok jika dibandingkan satu per satu terhadap konsentrasi 0% ($p < 0.05$). Namun tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar konsentrasi 22,5%, 25%, 27,5%, 30% dan 32,5% ($p > 0.05$) yang berarti bahwa ke lima konsentrasi tersebut memiliki efek yang sama dalam menurunkan jumlah koloni bakteri.

Uji korelasi parametric *Pearson* dilakukan untuk menganalisa hubungan antara variabel dependen (jumlah koloni bakteri) dan variabel independen (konsentrasi ekstrak). Dikatakan terdapat hubungan atau korelasi yang bermakna jika nilai $p < 0.05$. Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan nilai signifikansi (*P-value*) = 0,000 ($p < 0,05$) dan *correlation coefficient* -0.717 yang berarti terdapat korelasi bermakna antara dua variable (konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni bakteri). *Pearson correlation coefficient* (*r*) bernilai negatif berarti

korelasinya berbanding terbalik, yang artinya semakin tinggi dosis/konsentrasi ekstrak, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri, serta menunjukkan korelasi yang kuat ($r = 0.600-0.799$).

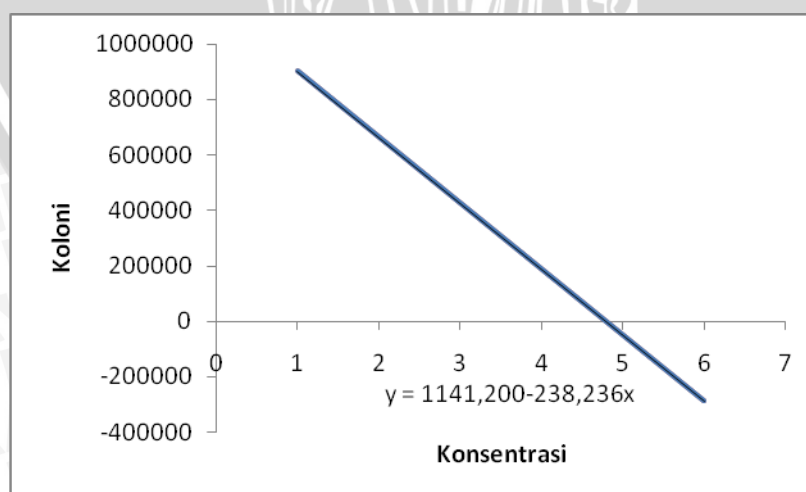
Uji regresi linier merupakan uji statistic yang dilakukan untuk mengetahui besar pengaruh variable independen (ekstrak dengan berbagai konsentrasi) terhadap variable dependen (jumlah koloni bakteri). Nilai R^2 (R square) dari tabel *Model summary* menunjukkan bahwa 51,4% ($0,514 \times 100\%$) dari variabel jumlah koloni bakteri dipengaruhi oleh variable independen yakni paparan ekstrak. Dengan kata lain sebanyak 51,4% bakteri mati dikarenakan oleh paparan ekstrak. Persamaan garis regresi menggunakan metode kuadrat terkecil (*least square method*) yang di dapat adalah:

$$y = 1141,200-238,236x$$

Keterangan: y = jumlah koloni bakteri;

x = konsentrasi ekstrak

Adapun bentuk kurva dari persamaan regresi di atas adalah sebagai berikut



Gambar 5.5 Grafik linieritas ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) terhadap jumlah koloni *Escherichia coli* pada setiap perlakuan

Dari Gambar 5.5. terlihat bahwa garis regresi antara pemberian ekstrak lada hitam dengan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh pada medium NAP mengarah ke kanan bawah.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan sampel bakteri yang diidentifikasi untuk membuktikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli*. Beberapa tes identifikasi yang dilakukan antara lain agar *Mac Conkey* dan agar EMB (*Eosin Methylene Blue*), tes agar TSI (*Triple Sugar Iron*), tes IMVIC MU (*Indole, Methyl red, Voges-proskauer, Citrate, Motility dan Urease*) serta pemeriksaan secara mikroskopis dengan pewarnaan Gram. Hasil identifikasi pada *Mac Conkey* koloni berwarna merah yang artinya adanya fermentasi laktosa, pada EMB menunjukkan warna koloni mengkilat seperti logam, sedangkan pada tes TSI (*Triple Sugar Iron*) diperoleh hasil bakteri berwarna kuning, terdapat produksi gas, namun tidak terdapat pembentukan H₂S. Pada tes yang lain yaitu Tes IMVIC MU (*Indole, Methyl red, Voges-proskauer, Citrate, Motility dan Urease*) menunjukkan hasil Indole positif yang ditunjukkan dengan adanya cincin merah pada *broth*, *methyl red* positif yang diakibatkan oleh bakteri yang membentuk asam sehingga warna menjadi merah, VP negatif karena tidak adanya perubahan warna media menjadi merah, *citrate* negatif yang ditunjukkan dengan tidak berubahnya warna media dari hijau menjadi biru, motilitas positif karena adanya bakteri motil yang menyebar pada bekas tusukan, dan urease negatif yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna menjadi merah keunguan yang artinya tidak dapat memecah urea menjadi ammonia. Sedangkan

pada pewarnaan Gram didapatkan koloni berbentuk batang dan bersifat Gram Negatif.

Nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) tidak dapat ditentukan dengan menggunakan metode dilusi tabung (*tube dilution test*) karena berdasarkan pengamatan, kekeruhannya tidak mempunyai pola yang teratur. Hal ini kemungkinan diakibatkan oleh 2 faktor yaitu faktor internal dan eksternal. Faktor internalnya adalah warna dari ekstrak lada hitam yang berwarna keruh sebelum diinkubasi yaitu coklat kehitaman. Sedangkan faktor eksternal adalah faktor yang berasal dari lingkungan seperti suhu, tekanan osmosis, kadar oksigen dan kadar air.

Kadar Bunuh Minimum (KBM) dapat ditentukan dengan metode dilusi tabung ,yang ditandai dengan adanya pertumbuhan koloni bakteri pada NAP <0,1% dari *Original Inoculum*. Sehingga dapat ditentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak lada hitam adalah 32,5 % .

Dari uji ANOVA yang dilakukan berdasarkan hasil Kadar Bunuh Minimum (KBM), didapatkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan efek antimikroba pada pemberian ekstrak lada hitam antara setiap perlakuan terhadap jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* yang dihasilkan pada medium NAP. Dari Uji Korelasi didapatkan nilai signifikan 0,000 dan koefisien korelasi -0,717 yang berarti pemberian ekstrak lada hitam mempunyai hubungan (korelasi) yang signifikan dengan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* dengan arah korelasi negatif artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak lada hitam cenderung akan menurunkan jumlah bakteri *Escherichia coli*. Kemudian dari Uji Regresi dapat diketahui seberapa besar pengaruh pemberian ekstrak lada hitam

terhadap jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* yang ditunjukkan dengan persamaan regresi linier $Y = 1141,200 - 238,236X$.

Pengaruh pemberian ekstrak lada hitam terhadap bakteri *Escherichia coli* kemungkinan disebabkan oleh zat-zat aktif yang terdapat didalam ekstrak lada hitam, diantaranya adalah seperti *flavonoida*, *saponin*, dan *piperine*. Mekanisme *flavonoid* memiliki kemampuan membentuk senyawa kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga mengganggu integritas dan merusak dinding bakteri yang menyebabkan bakteri lisis. *Saponin* bersifat merusak membran sel bakteri, dengan cara berikatan dengan kompleks polisakarida pada dinding sel. Sedangkan *piperine* dapat menghambat sintesis DNA dan dinding sel bakteri. Berdasarkan hasil penelitian dan analisis yang telah dilakukan oleh peneliti, yang dikhususkan pada lada hitam, didapatkan bahwa ekstrak lada hitam mempunyai efek antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Hal ini juga ditunjukkan dari hasil statistik yang menunjukkan hubungan kuat antar variabel, saat dilakukan uji statistik. Dengan melihat hasil penelitian yakni adanya penurunan jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* seiring dengan peningkatan konsentrasi perlakuan yang diperkuat dengan adanya teori bahwa lada hitam mengandung bahan aktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, maka dapat dikatakan bahwa lada hitam terbukti sensitif sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hal ini membuktikan bahwa hipotesa yang telah disusun sebelumnya adalah benar.

Ekstrak lada hitam terhadap bakteri *Escherichia coli* terbukti lebih efektif sebagai antimikroba apabila dibandingkan dengan beberapa ekstrak lain seperti bawang putih (*Allium sativum*) dan temu kunci (*Boesenbergia pandurata*). Hal ini ditunjukkan dengan nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak lada hitam

yang lebih kecil yaitu 32,5%,sedangkan nilai KBM pada bawang putih adalah 50% (Ramadanti, 2008) dan pada temu kunci adalah 70% (Choriqoh dkk.,2012)

Aplikasi klinis yang memungkinkan dari penelitian ini adalah penggunaan ekstrak lada hitam sebagai alternatif pengobatan penyakit yang ditimbulkan akibat infeksi *Escherichia coli* .

Keterbatasan pada penelitian ini antara lain pada metode pembuatan ekstrak lada hitam ini bersifat sederhana, sehingga proporsi jumlah bahan aktif yang terkandung didalamnya juga tidak diketahui secara pasti. Bahan aktif pada ekstrak lada hitam yang menjadi penghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* tidak diketahui secara pasti, bahan aktif manakah yang berperan memiliki peran paling besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Kemungkinan yang lain adalah adanya variasi biologis dari masing-masing lada hitam yang ditanam di suatu daerah mungkin efeknya tidak sama dengan yang ditanam di daerah lainnya. Faktor lain yang mempengaruhi adalah lamanya penyimpanan. Semakin lama disimpan, sensitivitas ekstrak kemungkinan efek antimikrobanya dapat menurun ataupun meningkat.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

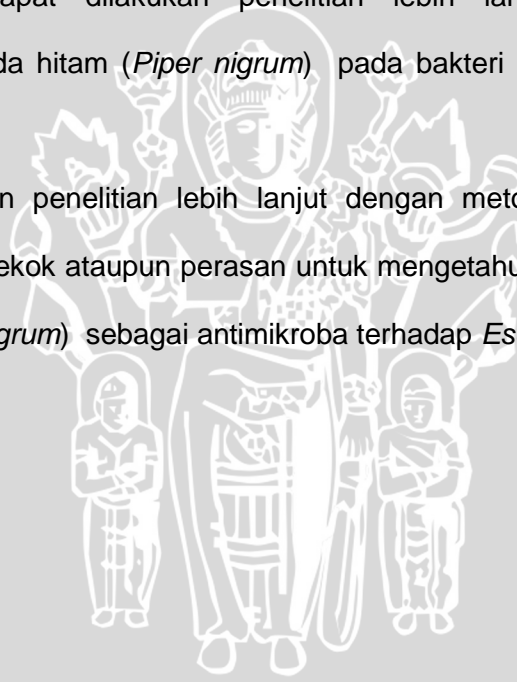
Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak lada hitam efektif sebagai antimikroba bakteri *Escherichia coli* .
2. Semakin besar ekstrak lada hitam yang digunakan maka jumlah bakteri akan semakin menurun.
3. Kadar Hambat Minimum (KHM) dari penelitian ini tidak dapat ditentukan karena sebelum maupun sesudah diinkubasi pertumbuhan bakteri pada masing – masing konsentrasi ekstrak tetap keruh sehingga tidak dapat diinterpretasikan KHMnya.
4. Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) yang dapat membunuh bakteri *Escherichia coli* adalah pada konsentrasi 32,5%.

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini adalah :

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bahan aktif apa yang paling berperan sebagai antimikroba pada ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) serta mekanisme kerja bahan aktif antimikroba tersebut.
2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui prosentase masing-masing bahan aktif yang terkandung di dalam ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*).
3. Perlu penelitian lebih lanjut untuk melihat efektivitas ekstrak lada hitam (*Piper nigrum*) pada hewan coba dan uji klinik sebelum digunakan sebagai alternatif pengobatan di masyarakat.
4. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek antimikroba lada hitam (*Piper nigrum*) pada bakteri lain, fungi maupun virus.
5. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode lain, misalnya dengan cara dekok ataupun perasan untuk mengetahui kemampuan lada hitam (*Piper nigrum*) sebagai antimikroba terhadap *Escherichia coli*



DAFTAR PUSTAKA

- Adel, 2009, Praktikum Pewarnaan Gram, (Online), ([http://www.scribd.com/doc/22654811 / Pewarnaan-Gram-Adel](http://www.scribd.com/doc/22654811/Pewarnaan-Gram-Adel)), diakses tanggal 10 Desember 2011)
- Agnol, R. Dall; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, D.; Nor, C.; Sarmiento, L; Lamb, L. 2003. *Antimicrobial Activity of Some Hypericum species*. Brazil: TANAC SA. Hal. 511-516.
- Amalina NL, 2008, Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol 70% Buah Merica Hitam (*Piper nigrum* L.) terhadap Sel HeLa. Makalah, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Arsyi, IA. 2008. Uji aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Dan Arbenan (*Duchesnea Indica Andr.Focke*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Multiresisten Antibiotik beserta Profil Kromatografi Lapisan Tipisnya. (online) ([http:// etd.eprints.ums.ac.id](http://etd.eprints.ums.ac.id)), diakses tanggal 13 Desember 2011)
- Berg, W., Keller, W., Michel, C., Susan, M. 1992 *Structural Principle of Flavanoid Antioxidant in Free Radical and the Liver*. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg. P. 68-69.
- Choriqoh A, Wahyunitisari MA, dan Wahjudi RMT. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Temu Kunci terhadap *Escherichia coli*. (Online), (<http://www.ijtmh.org/arsip-koleksi/80-september-2012/86-aktivitas-antimikroba-ekstrak-temu-kunci-terhadap-escherichia-coli.html>), diakses tanggal 18 Oktober 2012)
- Clark, M. 2005. E.coli, (Online), (<http://www.about-ecoli.com>) diakses pada 11 Desember 2011)
- Cowman, M.M. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, (Online), 12(4): 564-582 (<http://www.pubmedcentral.com>, diakses 16 Desember 2011).
- De Padua, L.S, Bunyaprahastra, Lemmens, J.R. 1999. *Medicinal and Poisonous Plants*. Bogor: Prosea, pp: 286-7.
- Dzen SM, Roekistiningsih, Santoso S, Winarsih S, Sumarno, Islam S, Noorhamdani, Murwani S, dan Santosaningsih D. 2003. *Bakteriologi Medik*, Edisi Kelima. Bayumedia Publishing, Malang, hal. 197-211.

Farmasi USD. 2006. *Escherichia coli*. (Online, <http://mikrobia.files.wordpress.com/2008/05/escherichia-coli2.pdf> diakses tanggal 10 Desember 2011).

Encyclopedia of Life. 2010. *E.coli* . (Online) , <http://eol.org/pages/972688/media> diakses tanggal 14 Desember 2011).

Hastomo, Infeksi Nosokomial, Managemen Rumah Sakit Div Epidemiologi Jogjakarta:2009. (Online), <http://www.scribd.com/doc/21378345/INFEKSI-NOSOKOMIAL-rumah-sakit> ,diakses tanggal 7 Desember 2011)

Lukito, H. 1998. *Rancangan Percobaan Suatu Pengantar*. Malang: IKIP. Hal: 25-75.

Machlin, L.J. 1991. *Handbook of Vitamins. 2nd Edition*. New York: Marci Dekker Inc. p. 572-575.

Madappa T, 2011 , *Escherichia coli* Infections ,(Online) [.\(http://emedicine.medscape.com/article/217485-overview#showall.html](http://emedicine.medscape.com/article/217485-overview#showall.html) diakses tanggal 11 Desember 2011)

Mandal P.;Sinha S.;Man, N.C. 2005. *Antimicrobial activity of saponins from Acacia auriculiformis*. (Online) <http://www.sciencedirect.com/science>, diakses tanggal 13 Desember 2011)

Muhammad,2011,*Khasiat Lada Hitam* ,(Online), <http://www.informasierbal.com/khasiat-lada-hitam.html> , diakses tanggal 6 Desember 2011)

Muhsin,B.2009.*Khasiat Tanaman Obat* . (Online) , <http://binmuhsinhabbatussauda.blogspot.com/2009/11/khasiat-tanaman-obat.html> ,diakses tanggal 6 Desember 2011)

Munif,2009,Perbandingan Kualitas Es di Lingkungan Universitas AlAzhar Indonesia dengan Restoran Fast Food di DaerahSenayan dengan Indikator Jumlah *Escherichia coli* Terlarut, (Online), <http://www.scribd.com/doc/62884139/e-Coli-Selesai-Insya-Allah.html> ,diakses 11 Desember 2011)

Nio, OK. 1989. *Zat-zat Toksik yang Secara Alami Ada pada Bahan Makanan Nabati*.(online)http://www.kalbe.co.id/files/ck/files/58_10_ZatZatToksikAlamiah.pdf/58_10_Zat-ZatToksikAlamiah.html diakses tanggal 13 Desember 2011)

Noviana H.Pola Kepekaan Antibiotika *Escherichia coli* yang Diisolasi dari Berbagai Spesimen Klinis.J.Kedokteran,Trisakti,2004,23 (4) : 122-123.

Puregreen. 2008. *The Health Benefits of Puregreen Tea* .(online) http://puregreen.me/How_Does_it_Brew_.html, diakses tanggal 15 Desember 2011)

- Raharni, Sugeng Riyanto, Koesniyo, 2000. Hubungan antara Waktu Kadaluwarsa Ampisilina dengan Daya Hambat Pertumbuhan *E. coli* secara *in vitro*. Jogjakarta, (Online), (<http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/14HubunganantaraWaktuKadaluwarsaAmpisilinadenganDayahambatPertumbuhan127.pdf/14HubunganantaraWaktuKadaluwarsaAmpisilinadenganDayahambatPertumbuhan127.html> ,diakses 11 Desember 2011)
- Ramadanti IA. 2008. Uji aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum Linn*) terhadap Bakteri *Escherichia coli* In Vitro . (online) (<http://eprints.undip.ac.id/23957/1/lrmudita.pdf> , diakses tanggal 18 Oktober 2012)
- Rangga. 2010. Lada Si Raja Rempah. (Online), (<http://blogs.unpad.ac.id/ranggacesar141/2010/06/02/lada-si-raja-rempah-3/> , diakses tanggal 20 Desember 2011)
- Samirah, Darwati, Windarwati, dan Hardjoeno. 2006. Pola dan Sensitivitas Kuman Di Penderita Infeksi Saluran Kemih. (Online),(<http://journal.unair.ac.id/filerPDF/IJCPML-12-3-02.pdf>) diakses tanggal 11 Desember 2011)
- Sarpian T,2007,Pedoman Berkebun Lada dan Analis Usaha Tani,Edisi Kelima,Kanisius,Yogyakarta,hal 15-31.
- Sussman, M. 1997. *Escherichia coli*:Mechanism of virulence. United Kingdom:Cambridge University Press. Page 263
- Sutarno dan Sandoko A, 2005 , Budi Daya Lada si Raja Rempah-Rempah ,Agromedia,Jakarta, (Online, (http://books.google.co.id/books/about/BudiDayaLadasiRajaRempahrempah.html?id=WhH3-iz7G2UC&redir_esc=y ,diakses tanggal 13 Desember 2011)
- Sutedja L dan Agustina H,1991, Uji Efek Antibakteri Minyak Lada (*Piper nigrum*) TerhadapBakteriPatogen,(Online), (<http://elib.pdii.lipi.go.id/katalog/index.php/searchkatalog/downloadDatabyld/4568/4569.pdf> ,diakses tanggal 6 Desember 2011)
- Suwandi U, 1999, Peran media untuk identifikasi mikroba pathogen,Kalbe Farma,Jakarta, (online), (<http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/10PeranMediauntukIdentifikasiMikroba124.pdf/10PeranMediauntukIdentifikasiMikroba124.htm> , diakses 12 Desember 2011)
- Triatmodjo, P. 1992. Pola Kuman Penyebab Diare Akut pada Neonatus dan Anak.Jakarta.,(online),(<http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/08PolaKuman086.pdf/08PolaKuman086.html> , diakses tanggal 12 Desember 2011)
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T. and Inuma, M. 1996. *Comparative Study On The Antibacterial Activity of Phytochemical Flavones Against Methicillin-resistant*

Staphylococcus aureus, J of Ethanopharmacology 50: 27-34. (online), (<http://www.ethnoleaflets.com/leaflets/auricula.html> ,diakses tanggal 13 Desember 2011)

Waroengsehat. 2010 . Khasiat Lada Hitam . (Online , <http://waroengsehat/21-khasiat-lada-hitam.html> ,diakses tanggal 11 Desember 2011)



LAMPIRAN

Lampiran 1 Pernyataan Keaslian Tulisan

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Indah Baktian Restu Margawuni

NIM : 0910710086

Program Studi : Pendidikan Dokter

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 di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 3 Desember 2012

Yang membuat pernyataan,

Indah Baktian Restu M

0910710086

Lampiran 2 (L2) Alat Dan Bahan



Gambar L2.1 Spektrofotometri



Gambar L2.2 Mikroskop



Gambar L2.3 Vortex



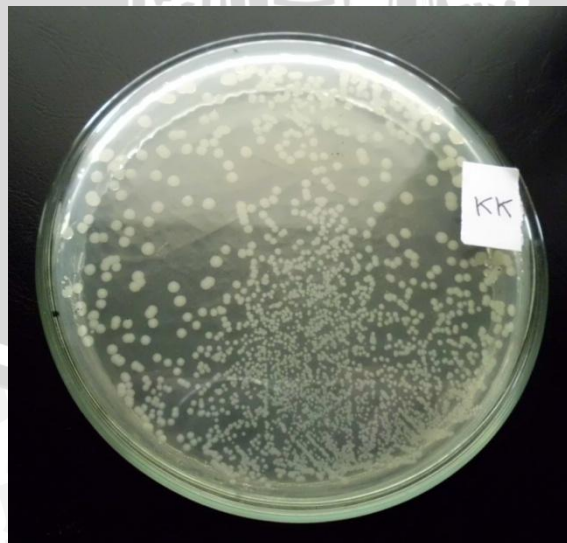
Gambar L2.4 Biji Lada Hitam

Lampiran 3 (L3) Identifikasi Bakteri dan Hasil Penelitian



Gambar L3.1 Hasil Inkubasi Kontrol Kuman Bakteri *Escherichia coli*

Kontrol kuman setelah diinkubasi nampak keruh



Gambar L3.2 Koloni bakteri pada Medium NAP

Koloni bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh berwarna putih kekuningan



Gambar L3.3 Pewarnaan Gram

Pada pengamatan di bawah mikroskop bakteri *Escherichia coli* gram negatif, berbentuk batang, dan berwarna merah

Lampiran 4 Uji Statistik

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Koloni
N		24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	307375,0
	Std. Deviation	579599,8
Most Extreme Differences	Absolute	,380
	Positive	,380
	Negative	-,298
Kolmogorov-Smirnov Z		1,860
Asymp. Sig. (2-tailed)		,102

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Homogenous subset

Test of Homogeneity of Variances

Koloni			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
14,723	5	18	,280



ANOVA

Koloni

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,6E+012	5	1,511E+012	157,742	,000
Within Groups	1,7E+011	18	9577819444		
Total	7,7E+012	23			

Post Hoc

Multiple Comparisons

Multiple Comparisons

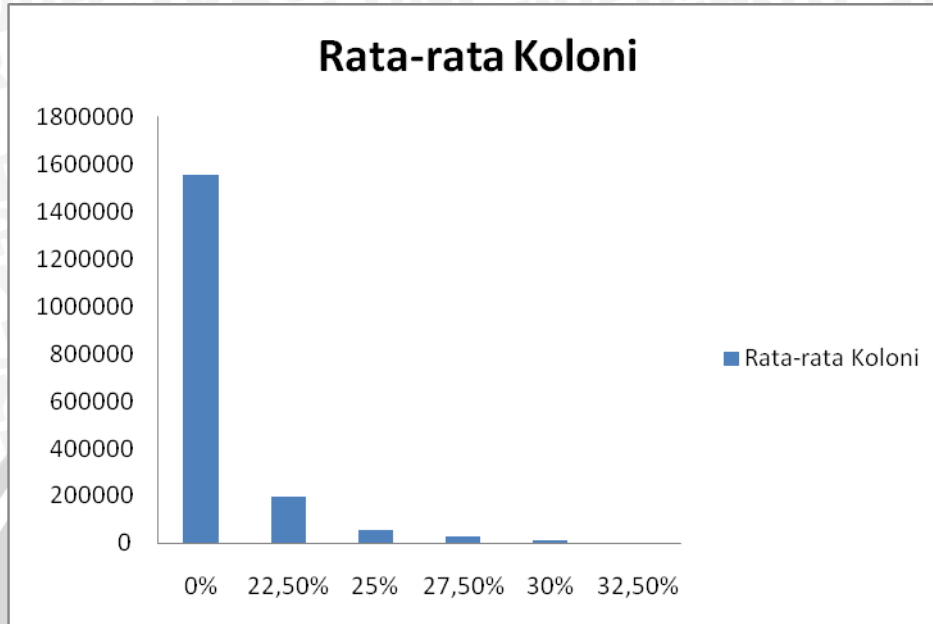
Dependent Variable: Koloni
Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0%	22,5%	1358000*	69202	,000	1138073,79	1577926,21
	25%	1500500*	69202	,000	1280573,79	1720426,21
	27,5%	1524500*	69202	,000	1304573,79	1744426,21
	30%	1540250*	69202	,000	1320323,79	1760176,21
	32,5%	1553500*	69202	,000	1333573,79	1773426,21
22,5%	0%	-1358000*	69202	,000	-1577926,21	-1138073,79
	25%	142500	69202	,350	-77426,21	362426,21
	27,5%	166500	69202	,206	-53426,21	386426,21
	30%	182250	69202	,139	-37676,21	402176,21
	32,5%	195500	69202	,098	-24426,21	415426,21
25%	0%	-1500500*	69202	,000	-1720426,21	-1280573,79
	22,5%	-142500	69202	,350	-362426,21	77426,21
	27,5%	24000	69202	,999	-195926,21	243926,21
	30%	39750	69202	,992	-180176,21	259676,21
	32,5%	53000	69202	,970	-166926,21	272926,21
27,5%	0%	-1524500*	69202	,000	-1744426,21	-1304573,79
	22,5%	-166500	69202	,206	-386426,21	53426,21
	25%	-24000	69202	,999	-243926,21	195926,21
	30%	15750	69202	1,000	-204176,21	235676,21
	32,5%	29000	69202	,998	-190926,21	248926,21
30%	0%	-1540250*	69202	,000	-1760176,21	-1320323,79
	22,5%	-182250	69202	,139	-402176,21	37676,21
	25%	-39750	69202	,992	-259676,21	180176,21
	27,5%	-15750	69202	1,000	-235676,21	204176,21
	32,5%	13250	69202	1,000	-206676,21	233176,21
32,5%	0%	-1553500*	69202	,000	-1773426,21	-1333573,79
	22,5%	-195500	69202	,098	-415426,21	24426,21
	25%	-53000	69202	,970	-272926,21	166926,21
	27,5%	-29000	69202	,998	-248926,21	190926,21
	30%	-13250	69202	1,000	-233176,21	206676,21

*. The mean difference is significant at the .05 level.



Means Plot



Uji Kolerasi

Correlations

		Konsentrasi	Koloni
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	-,717**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	24	24
Koloni	Pearson Correlation	-,717**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Uji regresi

Regression

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Konsentrasi	.	Enter

- All requested variables entered.
- Dependent Variable: Koloni

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,717 ^a	,514	,492	413058,973

- Predictors: (Constant), Konsentrasi
- Dependent Variable: Koloni

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	4,0E+012	1	3,973E+012	23,286	,000 ^a
	Residual	3,8E+012	22	1,706E+011		
	Total	7,7E+012	23			

- Predictors: (Constant), Konsentrasi
- Dependent Variable: Koloni

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1141200	192268,5		5,935	,000
	Konsentrasi	-238236	49369,990	-,717	-4,826	,000

- Dependent Variable: Koloni

Grafik Linearitas

