

**UJI EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL KULIT
KAYU KLUWIH (*Artocarpus altilis*) TERHADAP BAKTERI *E.*
*coli***

TA

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Disusun oleh:

Yosefin Eka Budiarti

0910710135

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

ABSTRAK

Eka, Yosefin. 2012. **Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Kayu Kluwih terhadap Bakteri *E. coli***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pmebimbing : (1) Prof. DR. dr. Sumarno, DAHK, MM, M. Kes. (2) dr. Onggung Napitupulu, M. Kes.

Bakteri *E. coli* adalah bakteri batang Gram negatif fakultatif anaerob yang dapat menyebabkan infeksi saluran pencernaan, dan infeksi saluran kemih. Kulit kayu kluwih (*Artocarpus alitlis*) diduga memiliki bahan-bahan aktif yang mempunyai efek antimikroba terhadap *E. coli*. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan metode dilusi tabung. Konsentrasi bakteri *E. coli* yang digunakan adalah 10^5 CFU/ml. Kelompok perlakuan yaitu kelompok bakteri *E. coli* yang diberi ekstrak etanol kulit kayu kluwih dengan konsentrasi 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%. Kelompok kontrol yaitu kelompok bakteri *E. coli* yang tidak diberi ekstrak atau konsentrasi ekstrak 0%. Analisis data menunjukkan adanya efek perubahan konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni bakteri *E. coli* yang tumbuh pada kelompok sampel yang berbeda secara signifikan (ANOVA,

$p < 0.05$). Uji korelasi menunjukkan adanya hubungan yang erat antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni (Korelasi, $R = -0.905$; $p < 0.05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit kayu kluwih memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *E. Coli* dengan nilai KHM 13% dan nilai KBM sebesar 15%.

Kata kunci : *E. coli*, ekstrak etanol kulit kayu kluwih, antibakteri.

ABSTRACT

Eka, Yosefin. 2012. The **Antibacterial Effect of Kluwih Bark Ethanol Extract (*Artocarpus altilis*) Against *E. coli***. Final Assignment. Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. DR. dr. Sumarno, DAHK, MM, M. Kes. (2) dr. Onggung Napitupulu, M. Kes.

E. coli is an anaerob facultative Gram negative bacilli that causes gastrointestinal and urinary tract infection. Kluwih (*Artocarpus altilis*) is known to have many active substances that have antibacteria effect. This research is conducted to prove the antimicrobial effect of kluwih barks ethanol extract against *E. coli*. This research used an experimental design with tube dilution method. The concentration of bacterial is 10^5 CFU/ml. The treated groups are group treated with kluwih barks ethanol extract with a range of concentrations which are 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%. The control group is group treated with 0% of extract. The data analysis shows an effect between differential concentration of extract and the number of colonies growth in sample groups with significant difference (ANOVA, $P < 0.05$). The correlation test shows a strong association between the concentration of extract and the number of colonies growth in sample groups with significant between the concentration of extract and the number (Correlation, $R = -0.905$; $p < 0.05$). The conclusion is kluwih barks ethanol extract has antibacteria effect against *E. coli* MIC is 13%, and MBC is 15%.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit infeksi adalah penyakit yang disebabkan karena masuknya bibit penyakit (A. Anne, 2012). Penyakit infeksi masih merupakan masalah kesehatan kesehatan yang dominan di Indonesia (A. Soebandrio, 2012).

Hingga saat ini terutama di negara berkembang, penyakit infeksi masih merupakan penyakit dengan prevalensi tinggi dan menjadi pembunuh nomor satu. Senyawa antibakteri merupakan senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri (Sefran, 2011). Penemuan awal dari pengobatan adalah ditemukannya penisilin pada media cawan petri pada tahun 1928 oleh Alexander Fleming yang menandai awal era baru dalam dunia pengobatan. Senyawa alami ini diproduksi oleh jamur *Penicillium*, yang ternyata toksik/beracun bagi bakteri namun aman bagi manusia (Y. Ertanto, 2011).

Setelah penemuan penisilin terjadi revolusi pencarian besar-besaran terhadap senyawa alami maupun sintesis yang dapat membunuh bakteri patogen lainnya. Peluang untuk pengobatan baru menjadi besar oleh karena revolusi penemuan obat-obat baru tersebut (Y. Ertanto, 2011).

Pengetahuan dan teknologi yang tersedia saat ini guna mendukung penemuan dan pengembangan obat baru jauh lebih berkembang dibandingkan

dengan sumberdaya yang tersedia bagi ilmuwan pada dekade yang silam. Namun demikian, para peneliti dan industri farmasi malah mengurangi secara signifikan biaya untuk evaluasi dan uji klinik terhadap senyawa antimikroba baru. Konsekuensinya, jumlah antimikroba baru dalam jalur pengembangan berkurang drastis pada satu dekade terakhir sehingga meningkatkan kekhawatiran akan ketersediaan pilihan terapi yang efektif di masa depan. Hal ini dikhawatirkan terjadi minimnya produk antibakteri di pasaran yang dapat digunakan untuk pengobatan dan adanya perkembangan resistensi dari antibakteri baru yang cepat (Yogi, 2011).

Obat tradisional asli Indonesia mulai mendapat perhatian di dunia kedokteran modern, bahkan digunakan masyarakat dunia. Selain lebih aman dibandingkan obat kimia, obat herbal juga terbukti ampuh. Slogan *back to nature* sepertinya terus didengungkan masyarakat dunia. Tidak hanya mencakup gaya hidup dan bidang arsitektur, dukungan kembali ke alam juga merambah dunia kesehatan. Penggunaan obat herbal atau obat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan untuk menyembuhkan berbagai penyakit semakin dilirik masyarakat. Penggunaan obat herbal juga dipicu karena adanya kegagalan penggunaan obat modern untuk penyakit tertentu dan semakin luasnya akses informasi mengenai obat herbal di seluruh dunia. Masih sedikitnya jenis fitofarmaka ini amat disayangkan. Padahal, Indonesia merupakan negara terkaya ke-2 di dunia setelah Brasil dalam hal jenis tanaman. Menurut data, spesies tumbuhan obat di dunia ada sekitar 40.000, dan Indonesia memiliki 30.000 di antaranya. Karena itu, penggunaan obat tradisional tengah gencar dilakukan oleh para dokter untuk mengoptimalkan penggunaan bahan alam untuk pengobatan (Sindo, 2011).

Sementara ini banyak orang beranggapan bahwa penggunaan tanaman obat atau obat tradisional relatif lebih aman dibandingkan obat sintetis. Walaupun demikian bukan berarti tanaman obat atau obat tradisional tidak memiliki efek samping yang merugikan, bila penggunaannya kurang tepat. Agar penggunaannya optimal, perlu diketahui informasi yang memadai tentang kelebihan dan kelemahan serta kemungkinan penyalahgunaan obat tradisional dan tanaman obat (Rega Afianti, 2012).

Zat antibakteri dapat bersifat membunuh bakteri (bakterisidal) atau menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik). Seiring dengan *trend back to nature* atau kembali ke alam, berbagai jenis tanaman obat kembali dicari sebagai antibakteri, dan dimanfaatkan masyarakat (Sefran, 2011).

Bakteri *E. coli* lebih sering digunakan sebagai objek dalam penelitian ilmiah dibandingkan dengan mikroorganisme lain. Organisme ini disamping merupakan penghuni utama usus besar, juga merupakan isolat penyebab utama infeksi saluran kemih, luka infeksi, pneumonia, meningitis, serta septisemia. Penelitian-penelitian terbaru juga menunjukkan bahwa galur tertentu dari bakteri *E. coli* juga merupakan organisme patogen intestinal yang menyebabkan berbagai penyakit gastrointestinal (Tim Mikro FKUB, 2003).

Kluwih dikenal luas oleh masyarakat Indonesia, karena menghasilkan buah yang memiliki nilai ekonomi cukup penting. Selain sebagai penghasil buah, kluwih juga merupakan penghasil kayu, terutama untuk bahan perkakas rumah tangga. Daunnya dapat digunakan sebagai obat luar pada penyembuhan pembengkakan limfa, dan bunganya untuk penyembuhan gigi (N. Rochmah, 2010).

Mengingat kluwih sangat mudah didapatkan dimana-mana dengan harga yang relatif murah dan juga prevalensi infeksi bakteri *E. coli* yang cukup besar, harga obat yang saat ini cenderung mahal serta efek samping yang cukup besar. Hasil bioautografi menunjukkan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada *S. aureus* multiresisten merupakan senyawa flavonoid, saponin dan fenolik, sedangkan pada *E. coli* multiresisten adalah senyawa flavonoid, artonin E, dan fenolik.

Maka ekstrak etanol kulit kayu kluwih layak dilakukan penelitian untuk menggali potensi ekstrak etanol kulit kayu kluwih sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli* sebagai alternatif yang mudah dan aman bagi masyarakat.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Apakah Ekstrak Etanol Kulit Kayu Kluwih (*Artocarpus altilis*, sp) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui apakah ekstrak etanol kulit kayu kluwih memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Untuk Mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak etanol kulit kayu kluwih (*Artocarpus altilis*, Sp) terhadap bakteri *E. coli*.

1. 3. 2. 2 Mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*.

1. 3. 2. 3 Untuk mengetahui korelasi antara konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih (*Artocarpus altilis*, Sp) terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli*.

1. 4 Manfaat Penelitian

1. 4. 1 Manfaat Akademik

1. 4. 1. 1 Menambah wawasan ilmu pengetahuan bidang Kedokteran khususnya mengenai manfaat ekstrak etanol kulit kayu kluwih (*Artocarpus altilis*, Sp) sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli*

1. 4. 1. 2 Sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut tentang manfaat ekstrak etanol kulit kayu kluwih (*Artocarpus altilis*, sp) terhadap bakteri *E. coli*.

1. 4. 2 Manfaat Praktis

Dapat digunakan sebagai dasar guna memahami penggunaan ekstrak etanol kulit kayu kluwih (*Artocarpus altilis*, Sp) sebagai antibakteri bakteri *E. coli*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Kulit Kayu Kluwih



(Dikutip dari <http://id.wikipedia.org/wiki/Kluwih>)

Gambar 2.1 Pohon dan daun kluwih

2. 1. 1 Distribusi

Tanaman kluwih merupakan salah satu tanaman yang ada di Indonesia dan memiliki beberapa sebutan yang berbeda-beda pada berbagai daerah, antara lain:

Gomu (Melayu), kulu (Aceh), kulur (Batak), kalawi (Minangkabau), kaluwih (Lampung), kelewih (Sunda), dan lain-lain (Elhasani, 2011).

2. 1. 2 Morfologi dan Taksonomi

2. 1. 1 Morfologi Tanaman Kluwih

Kluwih merupakan divisi dari *Magnoliophyta* yang terbagi dalam anggota family *Moraceae* dan spesies *Artocarpus altilis/ Artocarpus incise* (Park). Tanaman kluwih merupakan tanaman berkayu berwarna hijau keabu-abuan, kulit bertekstur tidak keras, dan tidak beraroma spesifik. Tinggi tanaman dapat mencapai 10-20 m, lebar tajuk pohon lebihdari 5 m. Akar tanaman kluwih berkayu, berbentuk bulat, berwarna cokelat kehitam-hitaman. Kulit relatif mudah terkelupas, beraroma spesifik, dan mudah mengeluarkan getah. Kluwih yang berasal dari perbanyakan generatif maupun vegetatif membentuk suatu *forma* perakaran yang kuat menebus dan melekat pada tanah. Oleh

karena itu, tanaman kluwih mampu tumbuh ditempat yang kurang ideal, antara lain ditebing-tebing dan sungai. Pada ujung cabang dan ranting tanaman tumbuh tunas pucuk sepanjang 10-20 cm. pucuk tersebut tertutup oleh selaput contong atau seludang. Setelah tunas pucuk mekar, akan muncul daun muda, yang kemudian tumbuh mencapai ukuran maksimal. Daun-daun kluwih terletak pada cabang atau ranting dengan teratur secara spiral, berjarak antara 2-10 cm. tangkai daun ranting dengan panjang antara 3-5 cm. Daun tebal seperti belulang, kaku, berwarna hijau tua, mengkilat di bagian atasnya dan berwarna hijau pucat serta kasar karena berbulu di bagian bawahnya. Bulu daun kluwih berwarna putih, terletak di atas dan bawah daun tulang daun. Ukuran daun bermacam-macam berkisar antara (30-60) cm x (20-40) cm, memiliki 7-9 lekuk dalam dengan ujung yang menyempit. Pangkal daun utuh, dengan tulang daun menonjol. Bunga tanaman kluwih berumah satu. Tandan bunga jantan dan bunga betina masing-masing terletak pada ketiak daun, bunga jantan menyerupai busa, panjang mencapai 25 cm atau lebih, berwarna kuning, mirip ekor kucing, terkulai ke bawah. Tandan bunga jantan tersebut terdiri atas kumpulan bunga kecil dengan *stamen* tunggal. Bunga betina berbentuk bulat atau bulat telur, berukuran (8x5 cm), berwarna hijau. Bunga betina terletak tegak kaku, pada tangkai tebal, yang memiliki panjang antara 4-8 cm. Bunga betina terdiri dari kumpulan bunga kecil yang terletak pada dasar bunga dengan kelopak berbentuk

tabung. Bunga kluwih menyerbuk silang. Buah kluwih merupakan buah majemuk, berbentuk tandan, dengan garis tengah antara 10-20 cm, berduri pendek, dan berwarna hijau. Di dalam buah terdapat biji berbentuk ginjal, panjang 3-5 cm, berwarna cokelat kehitaman, baik buah dan bijinya dapat dimanfaatkan sebagai bahan sayur (Ulie, 2010).

2. 1. 2 Susunan Taksonomi Tanaman Kluwih

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Orticales
Suku	: Moraceae
Marga	: Artocarpus
Jenis	: Artocarpus altilis
Nama umum	: Kluwih

2. 1. 3 Kandungan Aktif dan Manfaat Kluwih

Pada tanaman kluwih antioksidan alami terdapat dalam bagian daun, buah, akar, batang, dan biji dari tumbuh-tumbuhan obat. Bagian tersebut umumnya mengandung fenol dan polifenol. Polifenol dan turunannya, telah lama dikenal memiliki aktivitas antibakteri, antimelanogenesis, antioksidan, dan antimutagen (Ulie, 2010).

Senyawa-senyawa flavonoid dan turunannya dari tanaman nangka-nangkaan memiliki fungsi fisiologi tertentu. Ada dua kategori fungsi fisiologi senyawa flavonoid tanaman nangka-nangkaan

berdasarkan sebarannya di Indonesia. Tanaman nangka-nangkaan yang tumbuh di Indonesia bagian barat, produksi senyawa flavonoid diduga berfungsi sebagai bahan kimia untuk mengatasi serangan penyakit (sebagai antimikroba atau antibakteri). Sedangkan yang tumbuh di Indonesia bagian timur, produksi senyawa flavonoid diduga berfungsi sebagai bahan kimia untuk mengatasi serangan penyakit (antivirus) (Ulie, 2010).

Selain itu tanaman kluwih juga mengandung saponin dan polifenol. Saponin ada pada semua tanaman dengan konsentrasi tinggi pada bagian-bagian tertentu, dan dipengaruhi oleh varietas tanaman, dan pertumbuhan tanaman. Fungsi dalam pertumbuhan tidak diketahui, mungkin sebagai bentuk penyimpanan karbohidrat, atau tempat *waste product* dari metabolisme pertumbuhan. Kemungkinan lain sebagai pelindung terhadap serangan serangga (Ulie, 2011).

Bunga jantan dari kluwih dapat digunakan untuk sakit gigi dan daunnya dapat digunakan sebagai obat untuk sakit kulit (Zacky, 2010). Kluwih juga mengandung senyawa artoindonesianin. Artoindonesianin (berasal dari kata *Artocarpus* dan Indonesia). Artoindonesianin memiliki makna harfiah nangka Indonesia atau senyawa kimia dari nangka yang ditemukan pertama kali oleh orang Indonesia atau senyawa kimia dari nangka hasil riset yang didanai rakyat Indonesia. Artoindonesianin adalah senyawa kimia dari kelompok senyawa flavonoid dengan kerangka dasar dibentuk dari molekul artoindonesianin E yang terpenilasi, teroksigenasi, dan atau

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 bakteri adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji. Untuk menentukan KHM obat dapat juga dengan cara menggunakan medium agar padat yang disebut dengan metode *E test* (Dzen *et al.*, 2003).

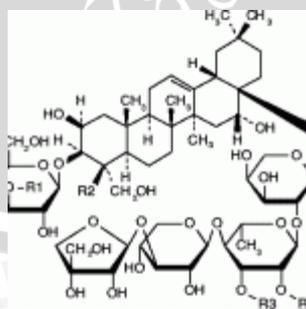
2.4.2 Metode Difusi Cakram

Prinsip dari metode difusi cakram adalah obat dijenuhkan ke dalam kertas saring atau cakram kertas. Cakram kertas yang mengandung obat tertentu kemudian ditanam pada media pembenihan agar padat yang telah dicampur dengan bakteri yang diuji, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan adanya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri (Dzen *et al.*, 2003).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolate bakteri sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dua cara seperti cara Kirby Bauer dan cara Joan-Stokes (Dzen *et al.*, 2003).

khusus flavonoid dalam memperkuat kesehatan manusia bervariasi tergantung pada jenis flavonoidnya (kimia, fisik, dan kondisi strukturalnya). Di antara jenis antioksidan kuat flavonoid adalah quercetin, catechin dan xanthohumol. Flavonoid dalam tanaman dapat bervariasi, tergantung pada kondisi pertumbuhan, kedewasaan, bagian tanaman, dan varietasnya. Manfaat flavonoid pada kesehatan manusia sebagian dijelaskan oleh aktivitas antioksidan. Karena kandungan bahan antioxidative pada flavonoid yang baik, sehingga dapat menunda atau mencegah timbulnya penyakit (seperti kanker) disebabkan oleh radikal bebas. Flavonoid juga menghambat oksidasi LDL oleh radikal bebas. Flavonoid telah dilaporkan memiliki korelasi negatif dengan insiden penyakit jantung koroner. Selain itu, flavonoid anti-bakteri, anti-virus, anti-tumor, anti inflamasi, antiallergenic, dan efek vasodilatory (Nadia, 2010). Mekanisme antibakteri pada flavonoid adalah disebabkan oleh senyawa artonin E, dengan menghambat pertumbuhan bakteri (Kuete, 2011).

2. 1. 3. 2 Saponin



(Dikutip dari <http://www.chemical-engineering.co/2012/11/29/saponin/>)

Gambar 2. 4 Senyawa kimia senyawa Saponin

Saponin adalah suatu glikosida yang mungkin ada pada banyak macam tanaman. Saponin ada pada seluruh tanaman dengan konsentrasi tinggi pada bagian-bagian tertentu, dan dipengaruhi oleh varietas tanaman dan tahap pertumbuhan. Fungsi dalam tumbuh-tumbuhan tidak diketahui, mungkin sebagai bentuk penyimpanan karbohidrat, atau merupakan *waste product* dari metabolisme tumbuh-tumbuhan. Kemungkinan lain adalah sebagai pelindung terhadap serangan serangga. 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 hidroksisteroid lainnya
- 6) Sulit untuk dimurnikan dan diidentifikasi
- 7) Berat molekul relatif tinggi, dan analisis hanya menghasilkan formula empiris yang mendekati.

Kandungan saponin yang ada (terutama pada bunga jantan) tanaman kluwih inilah yang bermanfaat sebagai pengusir serangga (terutama nyamuk). Oleh karena itu, penggunaan bunga jantan tanaman kluwih sebagai anti nyamuk bakar pada zaman dahulu ternyata relevan dengan teori ilmiah berdasarkan kandungan zat di dalamnya (Purnamaningrat, 2011).

2. 1. 3. 3 Polifenol

Memiliki sifat antioksidan lebih baik dibandingkan vitamin-vitamin dan menjadi obyek yang menarik perhatian para ahli nutrisi, epidemiologi, perusahaan agraria dan konsumen pada dekade terakhir. Keuntungan utama polifenol adalah efek melindungi terhadap berbagai penyakit seperti kanker dan penyakit kardiovaskular. Polifenol membantu melawan pembentukan radikal bebas dalam tubuh dan karenanya memperlambat penuaan sel (Ulie, 2010).

2. 2 Tinjauan Umum Bakteri *E. coli*

2. 2. 1 Epidemiologi

E. 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 (Tim Mikrobiologi FKUB, 2003). Sehingga penyebaran dari bakteri ini sangat luas dan dapat dengan mudah sekali menular. *E. coli* juga sering dimanfaatkan dalam bidang penelitian molekular sebagaivektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu, terkait dengan pertumbuhan yang sangat cepat dan penanganannya yang relatif mudah.

Menurut Yalun (2008), kita mungkin banyak yang tidak tahu jika di usus besar manusia terkandung sejumlah *E. coli* yang berfungsi membusukkan sisa-sisa makanan. Dari sekian ratus strain *E. coli* yang teridentifikasi, hanya sebagian kecil bersifat pathogen, misalnya strain O157:H7. Bakteri yang namanya berasal dari sang penemu Theodor Escherich yang menemukannya di tahun 1885 ini merupakan jenis bakteri yang menjadi salah satu tulang punggung dunia bioteknologi. Hampir semua rekayasa genetika di dunia bioteknologi selalu melibatkan bakteri *E. coli* akibat genetiknya yang sederhana dan mudah untuk direkayasa. Riset pada bakteri *E. coli* menjadi model untuk aplikasi ke bakteri jenis lainnya. Bakteri ini juga merupakan media kloning yang paling sering dipakai. Teknik recombinant DNA tidak akan ada tanpa bantuan bakteri ini.

2. 2. 2 Morfologi dan Identifikasi

Secara morfologi, bakteri *E. coli* berbentuk batang (basil), berukuran kecil (0,5x3,0mm), umumnya hidup pada rentang 20-40°C, optimum pada 37°C. Bersifat Gram negative 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 (Tim Mikrobiologi FKUB, 2003). Berdasarkan sifat-sifatnya bakteri *E. coli* ini termasuk dalam keluarga *Enterobacteriaceae*.

Selnya bisa terdapat tunggal, berpasangan, dan dalam rantai pendek, biasanya tidak berkapsul. Bakteri ini bersifat *aerobic obligat* dan dapat juga *aerobic* fakultatif dalam keadaan tertentu. *E. 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 speksitifitas antigen K tertentu atau terdapat pada asam polisakarida yang dibentuk oleh banyak bakteri *E. coli* seperti pada *Enterobacteriaceae*. Selanjutnya digambarkan sebagai antigen M dan dikomposisikan oleh asam kolanik (D. Siska, 2008).

Bakteri *E. coli* termasuk bakteri yang berbentuk batang, gram negatif, fakultatif anaerob, dan tak mampu membentuk spora (Irfan, 2012).

Klasifikasi bakteri *E. coli* adalah sebagai berikut:

Filum : Proteobacteria
Kelas : Gamma Proteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Familia : Enterobacteriaceae
Genus : Escherichia
Spesies : *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* termasuk bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan luar lipopolisakarida yang terdiri atas membran dan lapisan peptidoglikan yang tipis dan terletak pada periplasma (diantara lapisan luar dan membrane sitoplasmik)

(Anonym, 2007). Bakteri Gram negatif mengandung lipid, lemak, atau substansi seperti lemak dalam persentase lebih tinggi (11–12 %) daripada yang dikandung bakteri gram positif. Sedangkan struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih tipis (10–15 nm) dan berlapis tiga (multi) dari pada struktur dinding sel bakteri Gram positif. Lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri Gram negatif.



Gambar 2.5 *E. coli* pada media Eosin Methylen Blue (EMB)

2.2.3 Ciri-Ciri Pertumbuhan

E. 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.

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

2.2.3.1 Media Eosin Methylene Blue

Media ini mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk memilah bakteri yang memfermentasi laktosa seperti *E. 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, 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 *E. coli*.

2.2.3.2 Media 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 *E. 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*.

2.2.3.3 Media MacConkey Broth,

Walaupun media tidak tercantum di FI-IV, sebenarnya media ini bermanfaat sekali dalam memilah *E. 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 *E. coli* dari bakteri lain yang tidak memfermentasi laktosa, terutama *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Fermentasi laktosa oleh *E. 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 bakteri *E. coli* adalah *Enterobacter aerogenes*. Adapun cara memilah *E. aerogenes* antara lain dengan reaksi indole. Bakteri *E. coli* mempunyai reaksi positif, sedang *E. aerogenes* bereaksi negatif. Dengan sifat tersebut media ini sangat baik untuk memilah bakteri *E. coli* dari bakteri lain pada tahap awal terutama *P. aeruginosa*; *S. aureus* dan *Salmonella* (Analis, 2010).

2.2.4 Manifestasi Klinis

Infeksi bakteri *E. coli* pada manusia dapat menimbulkan bermacam-macam gejala dan keluhan. Adapun beberapa manifestasi dari infeksi bakteri *E. coli* yang paling sering dijumpai adalah:

1. Infeksi Saluran Kemih

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

memproduksi hemolisin, dan antigen K. Sedangkan pielonefritis berhubungan dengan adanya fimbria-P (Tim Mikrobiologi FKUB, 2003).

2. Diare

Diare adalah penyakit yang sering ditimbulkan oleh bakteri *E. 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 *E. coli* yang dapat menyebabkan diare dengan gambaran klinisnya masing-masing. Berikut adalah kelompok-kelompok *E. coli* yang berperan dalam diare:

a. *E. 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. *E. coli* Enterotoksigenik (ETEC)

Faktor kolonisasi ETEC menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil. Lumen usus teregang oleh cairan dan mengakibatkan hipermortilitas serta diare, dan berlangsung selama beberapa hari. Beberapa strain ETEC terdiri dari strain LT dan ST. ETEC dapat menghasilkan enterotoksin tahan panas (LT)

yang mirip dalam ukuran molekul, urutan, antigenisitas, dan memiliki fungsi yang mirip toksin kolera (CT). ETEC juga dapat menghasilkan toksin yang stabil panas (ST) yaitu ukuran molekul rendah dan tahan sampai mendidih selama 30 menit. Ada beberapa varian dari ST, yang ST1a atau STP ditemukan dalam *E. coli* terisolasi dari manusia dan hewan, sedangkan ST1b atau STh dominan dalam isolat manusia saja. ETEC menggunakan fimbrial adhesi (penonjolan dari dinding sel bakteri) untuk mengikat enterosit di usus halus.

c. *E. coli* Enterohemoragik (EHEC)

EHEC menghasilkan racun, yang dikenal sebagai *verotoxin* atau Shiga-like *toxins* karena kemiripan dengan racun yang diproduksi oleh *Shigella dysenteriae*. EHEC berhubungan dengan colitis hemoragik, bentuk diare yang berat dan dengan sindroma uremia hemolitik, suatu penyakit akibat gagal ginjal akut, anemia hemolitik mikroangiopatik, dan trombositopenia. *E. coli* menempel pada sel-sel usus dan menghasilkan *verotoxin* yang menyebabkan peradangan dan sekresi cairan usus. Toksin dari EHEC tersebut juga merusak lapisan jaringan usus besar dan ginjal. Toksin *E. coli* merusak lapisan usus besar dan jika toksin masuk ke dalam aliran darah, juga dapat mempengaruhi organ-organ lain, seperti ginjal.

d. *E. coli* Enteroinvasif (EIEC)

Enteroinvasif *Escherichia coli* (EIEC) merupakan patogen menyebabkan enteritis usus dengan mekanisme patogenisitas yang mirip dengan *Shigella*, yang menyebabkan invasi epitel usus besar sehingga menyebabkan peradangan dan ulserasi mukosa. Seringkali timbul gejala-gejala disentri basiler. Beberapa strain EIEC yang atipikal dalam reaksi biokimia dan dapat memfermentasi laktosa, dan bersifat non motil. Selain itu, strain EIEC dapat mengekspresikan

antigen somatik yang sangat baik terkait dengan antigen *Shigella*. Invasi EIEC dimediasi oleh plasmid besar (140 MDA) untuk produksi beberapa protein ekstrasel yang terlibat dalam invasi sel. Strain ini telah diisolasi. Enteritis EIEC berkaitan dengan kasus-kasus wabah yang terjadi pada wisatawan. Wabah seringkali terkait dengan konsumsi air atau makanan yang tercemar dan dari manusia ke manusia (M. Conrad, 2011)

e. *E. coli* Enteroagregatif (EAEC)

Patogenesis dari EAEC diawali dengan perlekatan pada ileum terminal dan kolon. Perlekatan pada ileum terminal atau kolon dilakukan oleh *hydrophobic aggregative fimbriae*. Kemudian beberapa strain dari EAEC memproduksi sitotoksin yaitu toxin yang menyandi plasmid and enterotoksin,

3. Sepsis

Sepsis terjadi bila pertahanan hospes tidak adekuat, *E. coli* kemudian masuk ke dalam peredaran darah dan menyebabkan sepsis. Bayi-bayi yang baru lahir sangat rentan terhadap sepsis karena bayi baru lahir tidak memiliki antibodi IgG. Sepsis juga bisa terjadi sebagai efek sekunder dari Infeksi saluran kemih (ISK) (Tim Mikrobiologi FKUB, 2003)

4. Meningitis

Sebagian besar kasus meningitis karena *E. coli* terjadi pada bayi baru lahir atau bayi di bawah usia 3 bulan. Pada orang dewasa meningitis terjadi karena rendahnya sistem imun, atau adanya luka pada kepala atau operasi untuk kepala sehingga bakteri bisa masuk melalui luka pada kepala. Hal ini juga dapat terjadi pada orang yang memiliki shunt CSF (alat untuk mengalirkan cairan yang berlebihan dari sekitar otak untuk mengurangi tekanan). Infeksi pada bayi dapat terjadi selama persalinan, atau dari bakteri yang diperoleh di rumah sakit, atau di

rumah. Bayi prematur dan rendah berat lahir berada pada risiko tinggi tertular meningitis.

E. coli menginvasi *blood-brain barrier* dan melakukan penetrasi ke dalam otak. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa mikroba tambahan dan faktor *host* berkontribusi terhadap invasi *E. coli* terhadap *blood brain barrier*.

2.2.5 Penentu Patogenisitas

Bakteri *E. 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

Bakteri *E. coli* mengandung antigen tipe K1 yang memiliki keunikan diantara antigen kapsuler bakteri *E. coli* yang lain karena kapsul ini tahan terhadap proses pembunuhan baik oleh neutrofil maupun serum normal manusia. Tipe antigen O pada bakteri *E. 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 kecil.

Fimbria dari bakteri *E. 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

Bakteri *E. coli* memproduksi 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 bakteri *E. 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, *E. coli* juga memproduksi dua enterotoksin yang tahan panas, *heat-stable* enterotoksin (ST) yaitu STa (ST-I) dan STb (ST-II)

3. Verotoksin (Shigalike toxin)

Bakteri *E. coli* yang diinfeksi oleh bakteriofaga 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) (Tim Mikrobiologi FKUB, 2003).

2.3 Cara Kerja Antibakteri

2.3.1 Menghambat Sintesis Dinding Sel

Dasar toksisitas selektif dari golongan antibakteri ini terletak pada perbedaan struktur dinding sel prokariot yang terdiri atas peptidoglikan, sedangkan pada sel eukariot tidak memiliki peptidoglikan sehingga golongan obat ini relatif aman sebagai obat antimikroba tetapi tidak mempunyai pengaruh terhadap fungi, parasit, maupun sel hospes. Obat antibakteri yang menghambat pembentukan dinding sel efektif pada saat bakteri sedang aktif membelah (Dzen *et al.*, 2003).

2.3.2 Merusak Membran Sel

Membran sel adalah lapisan tipis yang terletak di sebelah dalam dinding sel, tersusun oleh 60 % protein dan 40 % lipid yang umumnya berupa fosfolipid.

Membran sel merupakan barrier yang fungsinya mengatur keluar masuknya bahan- bahan dari dalam sel atau dari luar sel dan hanya bahan-bahan tertentu saja yang dapat melewatinya. Rusaknya membran sel dapat menyebabkan metabolit penting di dalam sel lolos keluar sel dengan akibat kematian sel. Sebagai contoh, antibakteri yang merusak membran sel adalah polimiksin-B, golongan poliene (amfoterisin-B), golongan azol (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol, itrakonazol) (Dzen *et al.*, 2003).

2.3.3 Menghambat Sintesis Protein

Dasar toksisitas selektif dari antibakteri yang menghambat sintesis protein adalah struktur ribosom sel prokariot (ribosom 70S) berbeda dengan sel eukariot (ribosom 80S). Namun demikian, perlu diingat bahwa mitokondria sel eukariot juga berisi ribosom 70S.

Ribosom 70S bakteri tersusun dari unit 50S dan 30S. Antibakteri yang berkerja pada unit ribosom 50S adalah kloramfenikol dan linkomisin dengan cara menghambat perpanjangan rantai polipeptida, serta eritromisin yang mekanisme kerjanya mencegah perjalanan ribosom di sepanjang mRNA. Antibakteri yang bekerja pada unit ribosom 30S adalah streptomisin dengan cara mengubah RRNA struktur kodon juga berubah, mengakibatkan *misreading* oleh antikodon pada tRNA. Tetrasiklin bekerja pada unit ribosom 30S dengan cara mengganggu perlekatan tRNA pada kompleks mRNA-ribosom (Dzen *et al.*, 2003).

2.3.4 Menghambat Sintesis Asam Nukleat

Mekanisme antimikroba selain dengan beberapa mekanisme di atas, antimikroba juga dapat bekerja dengan cara menghambat sintesis mRNA pada proses transkripsi misalnya rifampisin atau menghambat replikasi DNA pada proses pembelahan sel. Rifampisin bekerja dengan cara mengikat kuat enzim

DNA-dependent RNA polymerase. Setiap zat yang mengganggu sintesa ini akan mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan dan metabolisme sel bakteri (Dzen *et al.*, 2003).

2.3.5 Antagonis Metabolit

Aktivitas enzim seringkali dihambat oleh senyawa yang mempunyai struktur mirip dengan substrat asalnya. Senyawa penghambat ini bergabung dengan enzim sedemikian rupa sehingga dapat mencegah reaksi enzim dengan substrat dan reaksi enzim dengan substrat dan reaksi-reaksi katalitik. Kebanyakan senyawa penghambat tersebut bersifat analog dengan faktor-faktor pertumbuhan bakteri, misalnya vitamin, asam amino, purin, dan pirimidin. Senyawa penghambat seperti ini disebut senyawa anti metabolik yang cara kerjanya adalah dengan menghambat secara kompetitif terhadap sintesis metabolit esensial (Dzen *et al.*, 2003).

2.4 Uji Kepekaan terhadap Antibakteri *In Vitro*

Uji kepekaan bakteri terhadap obat-obatan secara *in vitro* bertujuan untuk mengetahui obat antibakteri yang masih dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh bakteri tersebut. Uji kepekaan terhadap obat antibakteri pada dasarnya dapat dilakukan melalui dua cara yaitu, metode dilusi tabung dan metode difusi cakram (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.1 Metode Dilusi Tabung

Prinsip metode dilusi tabung adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu bakteri 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 bakteri adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji. Untuk menentukan KHM obat dapat juga dengan cara menggunakan medium agar padat yang disebut dengan metode *E test* (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.2 Metode Difusi Cakram

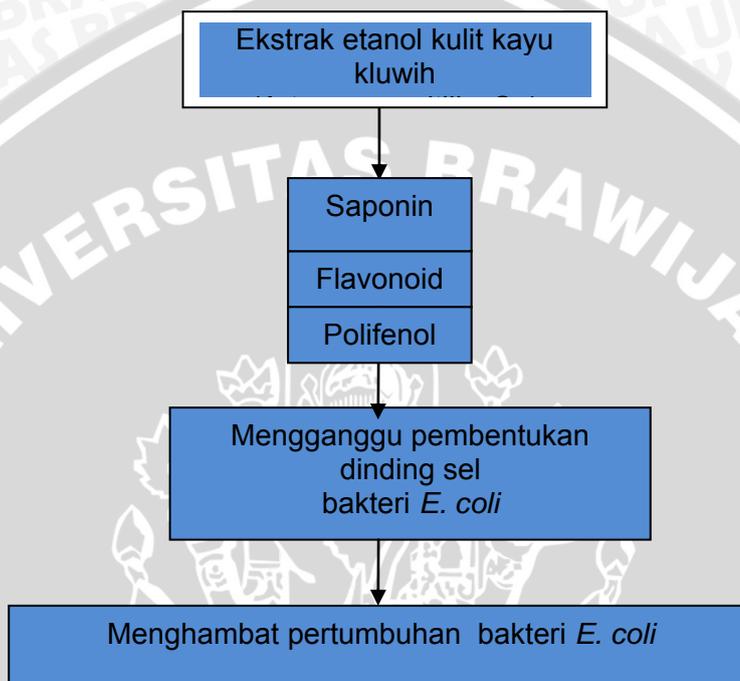
Prinsip dari metode difusi cakram adalah obat dijenuhkan ke dalam kertas saring atau cakram kertas. Cakram kertas yang mengandung obat tertentu kemudian ditanam pada media pembenihan agar padat yang telah dicampur dengan bakteri yang diuji, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian dilakukan pengamatan adanya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri (Dzen *et al.*, 2003).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolate bakteri sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dua cara seperti cara Kirby Bauer dan cara Joan-Stokes (Dzen *et al.*, 2003).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Senyawa dalam ekstrak etanol kulit kayu kluwih (*Artocarpus altilis*, Sp) mengandung senyawa flavonoid terpenilasi yaitu artoindonesianin, artonol B dan senyawa sikloartobilosanton yang bekerja mengganggu pembentukan dinding sel bakteri sehingga dapat disimpulkan ekstrak kulit kayu kluwih mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli*.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak kulit kayu kluwih (*Artocarpus altilis* sp) yang diberikan pada dosis yang tepat memiliki efek sebagai bahan antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan studi eksperimental laboratorium untuk mengetahui daya antibakteri ekstrak etanol kulit kayu kluwih (*Artocarpus atilis*) terhadap bakteri *E. coli*. Penelitian ini dilakukan untuk melihat efektivitas antimikroba kulit kayu kluwih (*Artocarpus atilis*, sp) terhadap bakteri *E. coli*.

4.2 Uji Penelitian Pendahuluan

Uji menggunakan ekstrak kulit kayu kluwih juga pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian dilakukan oleh Lubna Shahab (2010) mengenai Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Kulit Kayu Kluwih terhadap *S. Aureus* dan *E. coli* multiresisten Antibiotik. Kulit kayu kluwih dimaserasi dengan metanol, diperoleh ekstrak metanol. Ekstrak diuji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* multiresisten menggunakan metode dilusi padat mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM). Uji bioautografi dilakukan untuk mendeteksi golongan senyawa aktif yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit kayu kluwih memiliki nilai KBM terhadap *S. aureus* multiresisten dan *E. coli* multiresisten. Hasil bioautografi menunjukkan bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada *S. aureus* multiresisten merupakan senyawa flavonoid, saponin dan fenolik, sedangkan pada *E. coli* multiresisten adalah senyawa flavonoid, artonin E, dan fenolik.

Uji penelitian pendahuluan dalam penelitian ini dilakukan dengan metode dilusi tabung. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit kayu kluwih yang diekstrak dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Pertimbangan penggunaan etanol sebagai pelarut adalah dikarenakan etanol banyak digunakan sebagai pelarut berbagai bahan-bahan kimia yang ditujukan untuk konsumsi dan kegunaan manusia (Zyza, 2010). Tetapi toksisitas etanol relatif lebih rendah daripada metanol ataupun isopropanol (Darmono, 2010). Uji penelitian pendahuluan dilakukan dengan pengenceran ekstrak etanol kulit kayu kluwih dengan aquades. Konsentrasi yang dipakai adalah serial dosis dimulai dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 0%. Bakteri *E. coli* dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm. Lalu masing-masing tabung diambil 1 ose, dan digoreskan pada media NAP lalu diinkubasikan selama 24 jam dalam suhu 37°C. Lalu, dilakukan pengamatan pertumbuhan koloni bakteri *E. coli* pada NAP. Tujuan dilakukannya penelitian pendahuluan ini adalah untuk dapat mengetahui rentang konsentrasi dosis untuk penelitian selanjutnya.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan sampel penelitian berupa bakteri *E. coli* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan ekstrak etanol kulit kayu kluwih yang didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Obat Materia Medika, Batu.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit kayu kluwih dengan konsentrasi 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, dan 15%. Penelitian ini dilakukan dengan jarak range dosis 1% dikarenakan pada range dosis 1% perubahan pertumbuhan jumlah bakteri *E. coli* nampak jelas.

4. 3. 2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kekeruhan yang dapat diamati pada tabung dan jumlah koloni bakteri *E. coli* yang tumbuh pada medium NAP (*Natrium Agar Plate*).

4. 4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Agustus – Oktober 2012.

4. 5 Bahan dan Alat Instrumen Penelitian

4. 5. 1 Alat dan Bahan untuk Identifikasi Bakteri

1. Isolat bakteri *E. coli*
2. *Natrium Agar Plate* (NAP)
3. Inkubator
4. Larutan McFarland 0,5
5. Bahan Pewarnaan Gram :
 - Kristal Violet
 - Lugol
 - Safranin
6. Minyak emersi
7. Ose
8. Mikroskop binokuler

4. 5. 2 Alat dan Bahan untuk Ekstraksi Kulit Kayu Kluwih :

4. 5. 1. 1 Alat

- Evaporator
- Labu Evaporator
- Timbangan

- Gelas Erlenmeyer
- Waterbath
- Blender

4. 5. 1. 2 Bahan

- Kulit kayu kluwih
- Etanol 96%
- Aquades

4. 5. 3 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

1. Alat

- a. Tabung reaksi
- b. Pipet steril ukuran 1 mL dan 10 mL
- c. Karet penghisap
- d. Inkubator
- e. Vortex
- f. Bunsen
- g. Korek api
- h. Objek glass
- i. Plate kosong dan steril
- j. Alat penjepit (skalpel) steril
- k. *Colony counter*
- l. Kapas

2. Bahan

- a. Ekstrak etanol kulit kayu kluwih
- b. Suspensi bakteri dari *MH Broth*

4.5.4 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

1. Alat

- a. Obyek glass dan kaca penutup
- b. Lampu spiritus atau Bunsen
- c. Ose
- d. Mikroskop
- e. Minyak emersi
- f. Korek api

2. Bahan

- a. Suspensi bakteri dari *Muller Hinton Broth*
- b. Bahan pewarnaan Gram : Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin
- c. Aquades steril

4. 6 Definisi Istilah / Operasional

1. Isolat bakteri *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berasal dari urine penderita di Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang.
2. Ekstrak etanol kulit kayu kluwih adalah kadar atau konsentrasi kulit kayu kluwih yang telah dikeringkan, setelah itu dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi dan evaporasi (pemisahan zat-zat aktif dengan pelarutnya) menggunakan ethanol 96%.
3. Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada larutan yang berisi ekstrak kulit kayu kluwih dan suspensi bakteri tersebut

dalam tabung setelah diinkubasikan 18-24 jam. Definisi ini tidak berlaku jika ada reaksi antara bahan aktif dekok dengan media *Nutrient Broth* yang menyebabkan kekeruhan pada seluruh tabung.

4. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi minimal ekstrak kulit kayu kluwih yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *E. coli*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni pada medium NAP setelah diinkubasikan selama 18-24 jam yang dibandingkan dengan control negatif.
5. Kontrol bakteri (KK) adalah konsentrasi ekstrak etanol 0% yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri *E. coli* yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain. Kontrol bakteri (KK) berasal dari larutan bakteri uji yang telah distandardisasi dengan standar McFarland sebanyak 2 ml.
6. Kontrol bahan digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril. Kontrol bahan dibuat dengan cara mencampurkan antara ekstrak kulit kayu kluwih sebanyak 1 ml dengan aquades sebanyak 1 ml.
7. Original inoculum adalah inokulum bakteri *E. coli* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM.
8. Kadar konsentrasi yang digunakan untuk penelitian ini adalah 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%.
9. Tingkat kekeruhan pada masing-masing tabung dievaluasi menggunakan kertas putih bergaris-garis hitam yang diposisikan tepat dibelakang tabung.

4. 7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

Prosedur penelitian dilakukan dengan membuat serbuk kulit kayu kluwih terlebih dahulu, kemudian melakukan pemrosesan untuk membuat ekstrak etanol kulit kayu kluwih, identifikasi bakteri uji (*E. coli*), persiapan suspensi uji *E. coli* dan uji sensitivitas antibakteri.

4. 7. 1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Kayu Kluwih

4. 7. 1. 1 Proses Pengeringan

1. Kulit kayu kluwih dibersihkan dengan cara dibasuh dengan air mengalir.
2. Proses selanjutnya adalah memotong atau mengiris kecil-kecil kulit kayu kluwih untuk mempercepat proses pengeringan.
3. Kulit kayu kluwih dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama lebih kurang 2 hari hingga benar-benar kering.

4. 7. 1. 2 Proses Ekstraksi

1. Setelah melalui proses pengeringan, kulit kayu kluwih tadi kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender bumbu hingga berbentuk bubuk.
2. Timbang sebanyak 100 gr (sampel kering).
3. Masukkan 100 gr sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
4. Kemudian rendam dengan etanol 96% hingga volume 900 ml.
5. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
6. Didiamkan satu malam sampai mengendap.
7. Kulit kayu kluwih yang telah hancur tadi kemudian dicampur dengan etanol 96% sebanyak 3 kali.

8. Setelah dilakukan proses pelarutan ulang oleh etanol 96% tadi maka kulit kayu kluwih kemudian diuapkan secara bertahap di dalam evaporator; hasil akhir dari proses evaporasi ini adalah terbentuknya ekstrak kulit kayu kluwih yang siap dipergunakan dalam penelitian ini.

4. 7. 1. 3 Proses Evaporasi

1. Ambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif kulit kayu kluwih yang sudah terambil.
2. Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
3. Pasang labu evaporasi pada evaporator.
4. Isi water bath dengan air sampai penuh.
5. Pasang semua rangkaian alat, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath, (atur sampai (90°C) , sambungkan dengan aliran listrik.
6. Biarkan larutan etanol 96% memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
7. Tunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5$ sampai 2 jam untuk 1 labu).
8. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{3}$ dari kulit kayu kluwih kering.
9. Apabila tidak sedang digunakan dalam jangka waktu yang cukup lama maka ekstrak kulit kayu kluwih tadi dapat disimpan di dalam suatu botol plastik tertutup dan kemudian didiamkan atau disimpan dalam freezer.

4. 7. 2 Identifikasi Bakteri *E. coli*

4. 7. 2. 1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan Gram :

- Dibuat sediaan, dikeringkan di udara kemudian dilakukan fiksasi.

- Sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selam 1 menit.
- Sisa bahan pewarna dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi larutan lugol sebagai *mordant*, dibiarkan selama 1 menit.
- Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi alkohol 96 % sebagai peluntur selama 5-10 detik.
- Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik.
- Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100x.

4. 7. 2. 2 *Microbact* 12A/E-24E

- Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri *E. coli* dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negative menggunakan *Microbact system* 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E.
- Satu koloni bakteri *E. coli* yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 mL NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen.
- Larutan bakteri *E. coli* yang telah homogen ditetaskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian ditetaskan 2 tetes reagen Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol*

Kovact sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes.

- Untuk Uji fermentasi karbohidrat pada *microbact* 12B, tanpa ada penambahan reagen yaitu hasil dari sumuran langsung bisa dibaca hasilnya, yaitu jika fermentasi positif menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negatif tidak ada perubahan warna tetap biru.
- Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*.
- Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*).
- Nama spesies bakteri dilihat dengan *software microbact system* di komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat.

4.8. Pembenihan

Pada hari kedua, koloni bakteri *E. coli* ditanam pada *MH Broth* dan diinkubasikan pada suhu 37°–37,5°C selama 18-24 jam.

4. 8.1 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

4.8.1.1 Koloni dengan karakteristik sama diambil dari lempeng medium EMB, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*.

4.8.1.2 Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

4.8.1.3 Dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi di atas dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (*Optical Density*) dari suspensi.

4.8.1.4 Sesuai standar McFarland untuk mendapatkan konsentrasi bakteri *E. coli* sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5) yang setara dengan OD=0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut

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

Keterangan :

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (Hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume bakteri *E. coli* yang akan ditambah pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri *E. coli* (ml) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml.

4.8.2 Pengenceran Suspensi Bakteri *E. coli*

Dilakukan pengenceran suspensi bakteri *E. coli* dengan konsentrasi sebanyak 100 kali untuk mendapatkan konsentrasi bakteri *E. coli* 10^8 CFU/ml, caranya:

Dari 10 ml bakteri *E. coli* dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl sehingga konsentrasi bakteri *E. coli* menjadi 10^8 CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient Broth* sehingga konsentrasi bakteri *E. coli* menjadi 10^8 CFU/ml (Dzen dkk., 2003).

4.8.3 Uji Sensitivitas Antibakteri

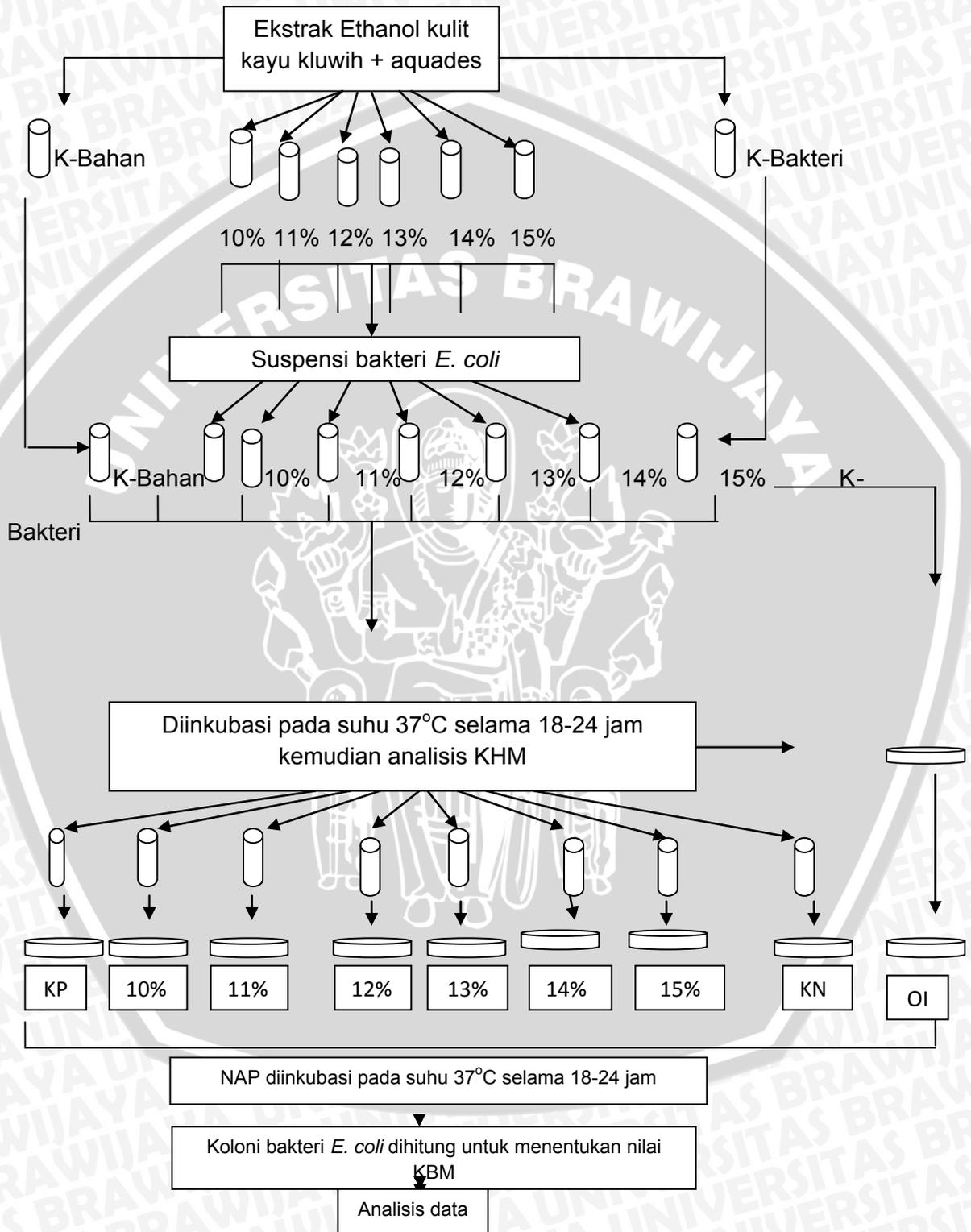
- Ekstrak etanol kulit kayu kluwih di sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
- Digunakan 7 tabung steril, dengan label 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol bahan, dan 1 tabung sebagai kontrol bakteri.
- Masukkan 0,90 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 10%, lalu tambahkan 0,1 ml ekstrak etanol kulit kayu kluwih.
- Masukkan 0,890 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 11%, lalu tambahkan 0,110 ml ekstrak etanol kulit kayu kluwih.
- Masukkan 0,880 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 12%, lalu ditambahkan 0,120 ml ekstrak etanol kulit kayu kluwih.
- Masukkan 0,870 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 13% lalu ditambahkan 0,130 ml ekstrak etanol kulit kayu kluwih.
- Masukkan 0,86 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 14%, lalu ditambahkan 0,14 ml ekstrak etanol kulit kayu kluwih.
- Masukkan 0,85 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 15% lalu ditambahkan 0,15 ml ekstrak etanol kulit kayu kluwih.
- Masukkan 1 mL ekstrak kulit kayu kluwih ke dalam tabung KP dan masukkan 1 mL suspensi bakteri saja ke dalam tabung KN.
- Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *E. coli* dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL ke dalam tabung 1-6.

- Ambil bakteri *E. coli* dari tabung bertanda KN sebanyak 1 ose kemudian digoreskan pada NAP sebagai *Original Inoculum* kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
- Setelah 18-24 jam, diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
- Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan dari seluruh tabung kemudian diinokulasikan pada media *Natrium Agar Plate (NAP)* yang berbeda, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°-37,5°C selama 18-24 jam.
- Jumlah koloni pada *Original Inoculum (OI)* dihitung dengan menggunakan *colony counter*.
- Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *E. coli* yang tumbuh dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% inokulum OI.

Tabel 4.1 Tabel Persiapan Ekstrak Etanol Kulit Kayu Kluwih

Tabung	konsentrasi (%)	ekstrak (ml)	aquades (ml)	total (ml)
1	10	0,100	0,900	
2	11	0,110	0,890	
3	12	0,120	0,880	
4	13	0,130	0,870	
5	14	0,140	0,860	
6	15	0,150	0,850	
Kontrol Bahan	100	1	0	
Kontrol Bakteri	0	0	0	

4.8.4 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antibakteri Kulit Kayu Kluwih Terhadap *E. coli*

Keterangan : K-Bahan : Kontrol Bahan

KHM : Kadar Hambat Minimum

K-Bakteri : Kontrol Bakteri (*E. coli*)

KBM : Kadar Bunuh Minimal

NAP : Nutrient Agar Plate

OI : Original Inoculum

4. 8 Estimasi Jumlah Sampel Minimal

Jumlah perlakuan yang diberikan ada enam, yaitu satu kontrol bakteri *E. coli* dan lima macam konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih. Jumlah pengulangan yang dilakukan dapat diketahui dengan rumus sebagai berikut (Lukito, 1998).

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$N \geq 4$$

Keterangan :

p = besar sampel

n = jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan di atas maka jumlah pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni *E. coli* pada NAP yang telah diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan batas kepercayaan 96.39%. Data yang diperoleh yaitu data konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu

kluwih dan jumlah koloni bakteri *E. coli*. Analisis yang digunakan adalah homogenitas dan normalitas Kolmogrov-Smirnov, Pos Hoc Tukey, uji Regresi Linier, uji korelasi parametric Pearson, dan uji beda parametrik One Way Anova. Uji One Way Anova digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan jumlah koloni bakteri setelah diberikan ekstrak pada berbagai konsentrasi. Uji Pos Hoc Tukey digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan signifikan jumlah koloni bakteri paska terpapar oleh ekstrak pada berbagai konsentrasi atau dengan kata lain perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni. Uji korelasi parametric Pearson dilakukan guna mengetahui apakah terdapat korelasi bermakna antara dua variabel (konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni bakteri *E. coli*). Dan uji yang terakhir dilakukan adalah Uji Regresi Linier, Uji regresi Linier ini dilakukan guna mengetahui besar pengaruh variabel independen, yaitu ekstrak etanol kulit kayu kluwih dengan berbagai konsentrasi terhadap variabel dependen, yaitu jumlah koloni bakteri *E. coli*.

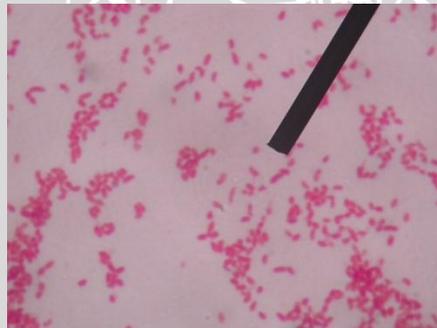
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Data Hasil Penelitian

5.1.1 Identifikasi Bakteri *E. coli*

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan adalah bakteri *E. coli* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum melakukan penelitian, dilakukan identifikasi ulang yang meliputi pewarnaan Gram dan *Microbact System Test*. Dari pewarnaan Gram didapatkan sel bakteri berbentuk batang, Gram negatif berwarna merah.



Gambar 5.1 *E. coli* dengan pengecatan Gram. Tampak pada ujung petunjuk bakteri Gram negatif berbentuk batang berwarna merah yang menandakan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *E. coli*.

Identifikasi dilanjutkan dengan uji biokimia, dalam penelitian ini digunakan *Microbact System test*. Sebelum dilakukan uji *Microbact* ini, bakteri diuji oksidase

dengan menggoreskan koloni bakteri pada *stick* oksidase dan dibiarkan 5 menit. Hasilnya menunjukkan oksidase negatif, yaitu dengan tidak adanya perubahan warna *stick* menjadi biru tua. Setelah itu dilanjutkan uji *Microbact* dengan memasukkan suspensi bakteri ke dalam 12A/E sumuran *Microbact system* dan diinkubasi 18 jam pada suhu 37°C.

Berikut adalah hasil *Microbact test* :

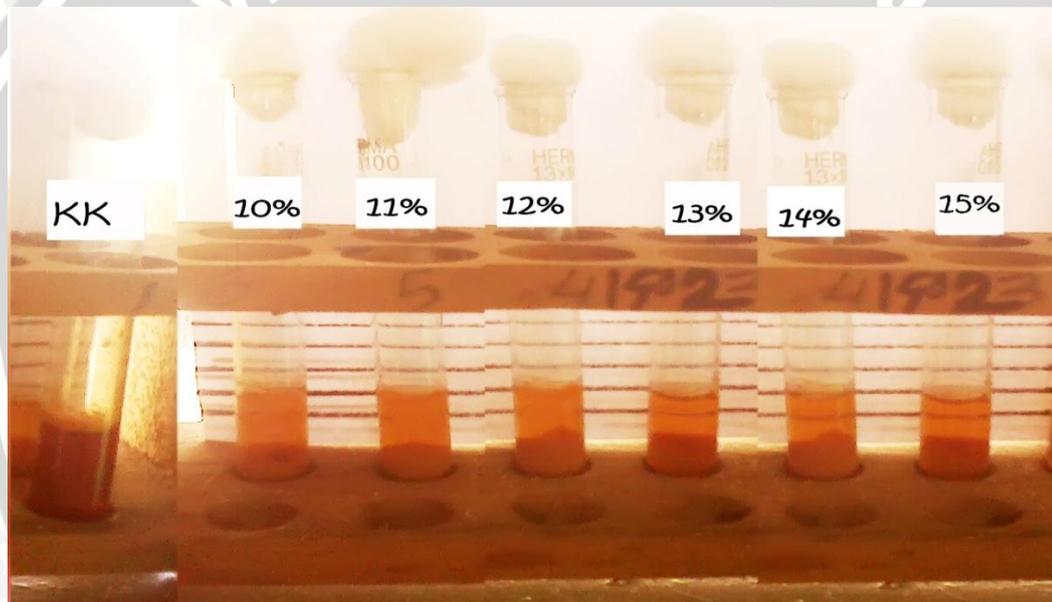
OXOID MICROBACT™ IDENTIFICATION KITS		MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E															16/12/11												
		GNB 12A / 12E												GNB 24E			GNB 12B												
		Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Saltin	Arginine	
Result / Resultado / Ergoniss / Resultat / Resulto / Resultat / Resultat / Resultado / Αποτέλεσμα		-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sum / Suma / Somme / Somme / Somme / Sum / Summa / Σομα / Αθροισμα		4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	
Identification / Identificación / Identification / Identification / Identification / Identificando / Identificando / Identificando / Ταυτοποίηση		E. coli 96,39%																											

Gambar 5.2 Hasil Scan *Microbact Test*. Berdasarkan angka-angka oktal pada gambar di atas, bakteri yang digunakan diyakini 96,39% sebagai *E. coli*.

5.1.2 Hasil Penentuan KHM

Kadar hambat minimal adalah kadar terendah dari antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung), setelah diinkubasi 24 jam. Pengamatan kekeruhan larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih dilakukan dengan mata telanjang. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan beberapa konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih yang diperoleh dari penelitian pendahuluan sebelumnya. Konsentrasinya adalah

10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, dan KK. Pengamatan pertumbuhan bakteri untuk menentukan KHM menggunakan metode dilusi tabung dengan cara mengamati tingkat kekeruhan pada masing-masing tabung yang dibantu dengan kertas putih bergaris-garis hitam yang diposisikan tepat dibelakang tabung. Bila semakin jernih maka garis hitam semakin terlihat, menandakan terhambatnya pertumbuhan bakteri. Sebaliknya, bila semakin keruh maka garis hitam akan semakin tidak tampak, ini menandakan banyak bakteri yang tumbuh pada tabung tersebut.



Gambar 5.3 Dilusi tabung dengan beberapa konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* untuk uji KHM. Dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak, pertumbuhan bakteri semakin berkurang. Hal ini tampak dari tabung kadar KHM adalah 13%.

Gambar 5.3 menunjukkan percobaan untuk mengetahui KHM dengan metode dilusi tabung yang berisi campuran ekstrak etanol kulit kayu kluwih dan bakteri dengan konsentrasi 0% (Kontrol Kuman/KK), 11%, 12%, 13%, 14%, 15%.

Tabung akan diinkubasikan selama 24 jam kemudian dilihat tingkat kekeruhannya menggunakan kertas bergaris-garis hitam yang diposisikan tepat di belakang tabung.

Hasil pengamatan pada tabung (Gambar 5.3) setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam tampak bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih yang diberikan, semakin sedikit bakteri *E. coli* yang tumbuh (bandingkan dengan tabung KK atau konsentrasi 0% dan garis-garis hitam semakin jelas).

Konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri disebut sebagai kadar hambat minimal (KHM) ekstrak etanol kulit kayu kluwih sebagai antibakteri. Berdasarkan Gambar 5.3, penulis menetapkan konsentrasi KHM adalah 13%..

5.1.3 Hasil Penentuan KBM

Kadar Bunuh Minimal adalah kadar terendah dari antibakteri yang dapat membunuh bakteri (ditandai dengan tidak adanya bakteri yang tumbuh pada NAP), atau pertumbuhan koloninya kurang dari 0.1% dari jumlah inokulum awal (Original Inoculum/OI) pada medium NAP yang telah dilakukan *streaking* sebanyak satu ose. KBM ekstrak etanol kulit kayu kluwih pada penelitian ini dapat ditentukan. Hal ini didapat dari hasil *streaking* larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih pada NAP, dengan meningkatnya konsentrasi didapatkan penurunan jumlah pertumbuhan bakteri *E. coli*

Dari hasil uji dilusi dilakukan penanaman dengan metode *streaking* pada media NAP (*Natrium Agar Plate*) untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM).

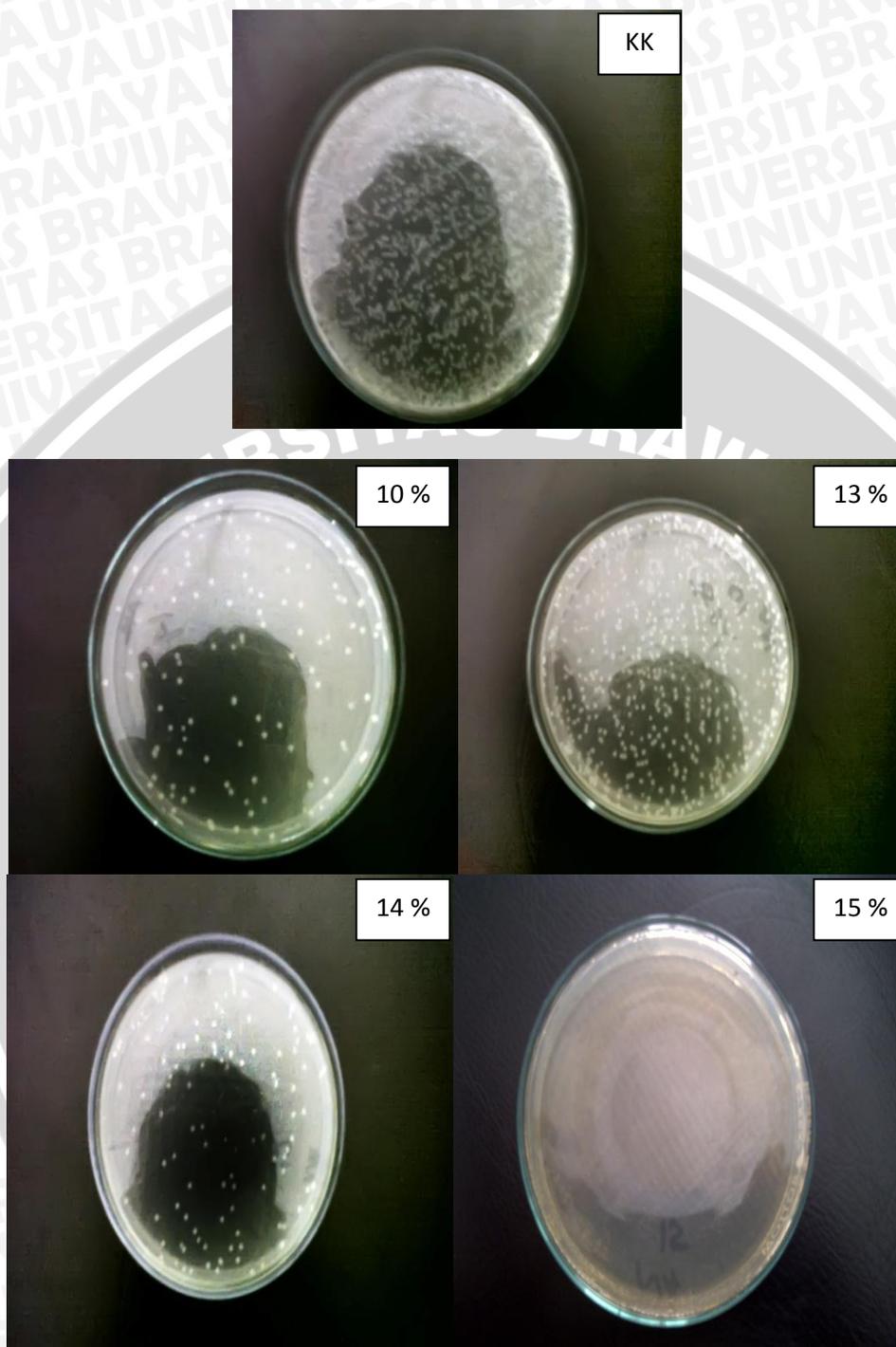
Setelah itu dilakukan perhitungan jumlah koloni pada masing-masing konsentrasi dan perulangan dengan alat *colony counter*.

Berikut tabel dan gambar hasil penanaman pada masing-masing konsentrasi :

Tabel 5.1 Jumlah koloni *E. coli* pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Kayu Kluwih

Konsentrasi	Jumlah Koloni (CFU/Plate) Rata-rata
0% (KK/Kontrol Bakteri)	218250
10%	689.5
11%	358.25
12%	17.025
13%	11
14%	0.7125
15%	0





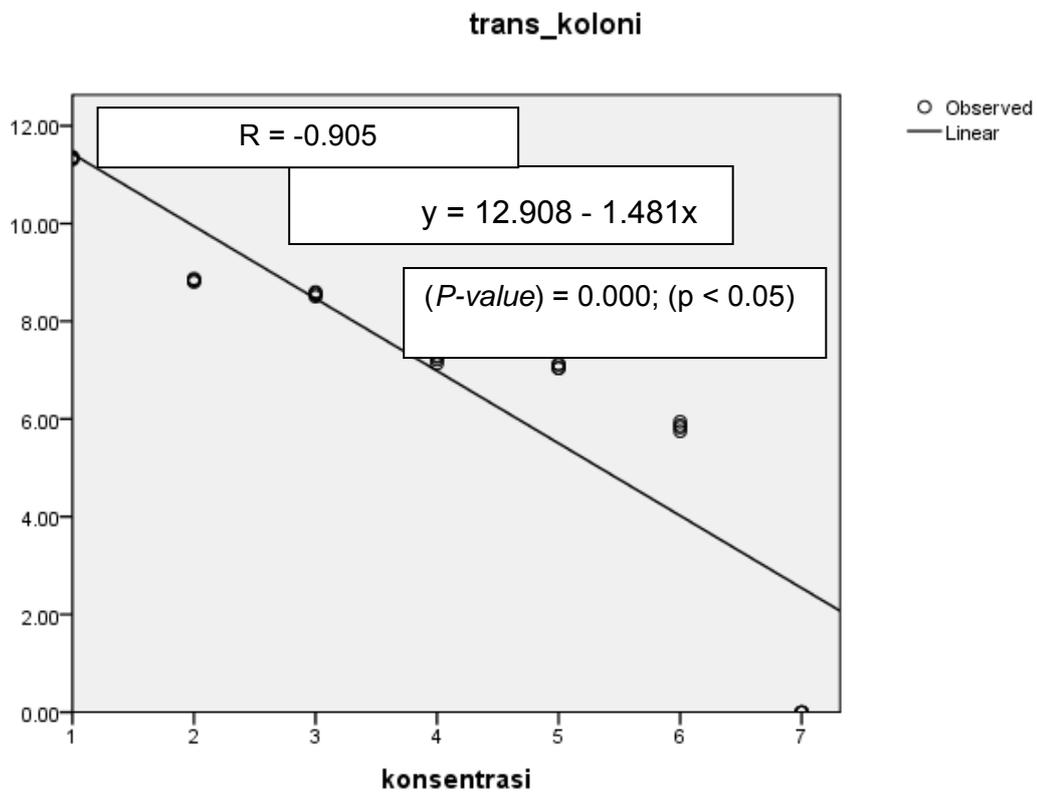
Gambar 5.4 Hasil *Streaking E. coli* pada Medium NAP untuk uji KBM.

Pada gambar 5.4 *E. coli* digoreskan pada *plate* dengan konsentrasi ekstrak 0%, 10%, 13%, 14% dan 15%. Tampak koloni yang tumbuh (berupa bintik-bintik putih) pada konsentrasi 0% lebih banyak dibandingkan 10%; *E. coli* dengan konsentrasi ekstrak 13% dan 14%. Koloni bakteri tumbuh banyak pada konsentrasi 13% daripada konsentrasi 14%; *E. coli* dengan konsentrasi ekstrak 15%, koloni bakteri tidak tumbuh sama sekali pada konsentrasi 15%

Berdasarkan Gambar 5.4 dan Tabel 5.1 diperoleh nilai KBM pada konsentrasi 15% dimana konsentrasi ini memenuhi syarat KBM yaitu $< 0,1\%$ dari OI (*Original Inoculum* : 268×10^4 CFU/mL). Dapat terlihat pola dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih, jumlah koloni bakteri *E. coli* yang tumbuh pada medium NAP (Natrium Agar Plate) semakin berkurang.



Hal ini nampak lebih jelas pada gambar berikut :



Gambar 5.5 Kurva Regresi Linier Jumlah Koloni untuk Masing-masing Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit Kayu Kluwih dimulai dari Konsentrasi Rendah ke Konsentrasi Tinggi; y = jumlah koloni bakteri, x = perlakuan dengan ekstrak etanol kulit kayu kluwih

5.2 Analisis Data

Data jumlah koloni bakteri *E. coli* terlebih dahulu diuji untuk normalitas dan homogenitasnya sebagai uji prasyarat agar bisa dilakukan uji beda parametric *One Way Anova*. Jika dari hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data yang normal ($p > 0.05$) dan uji homogenitas menyatakan bahwa data penelitian homogen ($p > 0.05$), maka dapat dilakukan uji beda parametric *One Way Anova*. Berdasarkan hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, distribusi data jumlah koloni bakteri tidak normal ($p = 0.000$) dan berdasarkan hasil uji homogenitas, data tidak homogen ($p = 0.000$). Sehingga data jumlah koloni bakteri *E. coli* tidak dapat dianalisa dengan uji beda *One Way Anova*.

Dilakukan transformasi data dengan melakukan logaritma terhadap data jumlah koloni bakteri *E. coli*, untuk kemudian dianalisis kembali dengan uji normalitas dan homogenitas. Bila data transformasi jumlah koloni terdistribusi normal dan homogen maka bisa dilanjutkan ke uji beda parametric *One Way Anova*. Akan tetapi, meskipun data transformasi jumlah koloni bakteri *E. coli* terdistribusi normal (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0.132$) dan homogen ($p = 0.067$). Dengan demikian data bisa diolah dengan menggunakan uji beda parametric *One Way Anova*.

Uji beda parametric *One Way Anova* dilakukan guna mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *E. coli* paska terpapar oleh ekstrak etanol kulit kayu kluwih dengan berbagai konsentrasi. Dikatakan terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *E. coli* yang bermakna jika $p < 0.05$. Dari uji beda *Pos Hoc*, terdapat perbedaan yang bermakna atau signifikan jumlah koloni

bakteri *E. coli* paska terpapar oleh ekstrak etanol kulit kayu kluwih pada berbagai konsentrasi ($p = 0.000$) atau dengan kata lain perbedaan konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri. *E. coli*.

Selanjutnya dilakukan uji multi komparasi Pos Hoc Tukey guna melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam konsentrasi yang berbeda.

Terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *E. coli* yang bermakna antara kelompok konsentrasi 0% jika dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan termasuk ($p < 0.05$). Jumlah koloni bakteri *E. coli* pada konsentrasi 15% berbeda signifikan dengan semua kelompok konsentrasi ($p < 0.05$). (Lihat tabel Pos Hoc)

Uji korelasi parametric Pearson menunjukkan nilai signifikansi ($P\text{-value}$) = 0.000 ($p < 0.05$) dan *correlation coefficient* -0.905 yang berarti terdapat korelasi bermakna antara dua variable (konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih terhadap jumlah koloni bakteri *E. coli*). *Pearson correlation coefficient* (r) bernilai negatif berarti korelasinya berbanding terbalik, yang artinya semakin tinggi dosis/konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri *E. coli*, serta menunjukkan korelasi yang sangat kuat ($r > 0.799$).

Note: : r = koefisien korelasi, menunjukkan kekuatan hubungan. Korelasi lemah ($r < 0.500$), korelasi sedang ($r = 0.500-0.599$), korelasi kuat ($r = 0.600 - 0.799$), korelasi sangat kuat ($r > 0.799$)

Kesimpulan, nilai $R = -0.905$ yang berarti terdapat korelasi bermakna (korelasi yang sangat kuat) antara dua variable (konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih terhadap jumlah koloni bakteri *E. coli*).

Uji regresi linier

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 81.9% ($0.819 \times 100\%$) dari variabel jumlah koloni bakteri *E. coli* dipengaruhi oleh variable independen yakni paparan ekstrak etanol kulit kayu kluwih. Dengan kata lain sebanyak 81.9% bakteri *E. coli* mati dikarenakan oleh paparan ekstrak etanol kulit kayu kluwih. Persamaan garis regresi menggunakan metode kuadrat terkecil (*least square method*) yang di dapat adalah:

$$y = 12.908 - 1.481x$$

Keterangan: y = jumlah koloni bakteri *E. coli*

x = konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih

Adapun bentuk kurva dari persamaan regresi di atas telah ditampilkan sebelumnya (lihat Gambar 5.5).

BAB 6

PEMBAHASAN

Data jumlah koloni yang diperoleh dengan 4 kali pengulangan kemudian dianalisis dengan uji statistik menggunakan software *SPSS 16 for Windows*[®]. Pada tiap pengulangan/replikasi didapatkan hasil yang berbeda-beda dari jumlah koloni bakteri *E. coli* yang tumbuh pada medium NAP. Hal ini dapat terjadi dikarenakan kemungkinan saat pemindahan bakteri dari tabung ke plate untuk ditanam, kemungkinan konsentrasinya kurang tepat. Untuk menghindari terjadinya bias tersebut, maka dilakukan pengulangan. Analisis data penelitian ekstrak etanol kulit kayu kluwih terhadap bakteri *E. coli* dilakukan dengan Uji homogenitas dan uji Normalitas Kolmogrov Smirnov, One Way Anova test, Uji multi komparasi Pos Hoc Tukey, dan Uji Regresi Linier. Semua analisis dihitung berdasarkan batas kepercayaan 95%, artinya kemungkinan kesalahan hasil penelitian berkisar 5%.

Syarat untuk dapat dilakukannya uji beda parametric One Way Anova adalah dilakukan uji prasyarat, yaitu uji homogenitas dan uji normalitas Kolmogrov-Smirnov. Jika hasil uji normalitas Kolmogrov-Smirnov menunjukkan distribusi data yang normal ($p > 0.05$) dan uji homogenitas menyatakan bahwa data penelitian homogen ($p > 0.05$), maka dapat dilakukan uji beda parametric One Way Anova. Berdasarkan data dari hasil penelitian, hasil uji normalitas Kolmogrov-Smirnov jumlah koloni bakteri tidak normal ($p = 0.000$) dan berdasarkan hasil uji homogenitas, data tidak homogen ($p = 0.000$). Sehingga data jumlah koloni bakteri *E. coli* tidak dapat dianalisa dengan Uji beda parametrik One Way Anova.

Karena data jumlah koloni bakteri tidak normal dan data tidak homogen, maka dilakukan transformasi data dengan melakukan logaritma terhadap data jumlah koloni bakteri *E. coli*, untuk kemudian dianalisis kembali dengan uji normalitas dan homogenitas. Bila data transformasi jumlah koloni terdistribusi normal dan homogen, maka dapat dilanjutkan ke Uji Beda One way Anova. Akan tetapi, meskipun data transformasi jumlah koloni terdistribusi normal (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0.132$) dan homogen ($p = 0.067$). Dengan demikian data bisa diolah dengan menggunakan uji beda parametric One Way Anova.

Selanjutnya dilakukan uji beda parametric One Way Anova. Uji beda parametric One Way Anova dilakukan guna mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *E. coli* paska terpapar oleh ekstrak etanol kulit kayu kluwih dengan berbagai konsentrasi. Dikatakan terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna jika $p < 0.05$. Dari uji beda Pos Hoc, terdapat perbedaan yang bermakna atau signifikan jumlah koloni bakteri paska terpapar oleh ekstrak etanol kulit kayu kluwih pada berbagai konsentrasi ($p = 0.000$) atau dengan kata lain perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri *E. coli*.

Setelah dilakukan uji beda parametric One Way Anova, dilakukan uji multi komparasi Pos Hoc Tukey. Uji multi komparasi Pos Hoc Tukey, dilakukan guna melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *E. coli* antara dua macam dosis yang berbeda. Dikatakan uji multikomparasi Pos Hoc Tukey bermakna jika $p < 0.05$, artinya terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *E. coli* antara dua macam dosis berbeda. Dari data tersebut didapat nilai $p < 0.05$ sehingga dapat dikatakan benar-benar terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *E. coli* pada dua dosis yang berbeda. Terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri

E. coli yang bermakna antara kelompok konsentrasi 0% jika dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan termasuk ($p < 0.05$). Jumlah koloni bakteri pada konsentrasi 15% berbeda signifikan dengan semua kelompok konsentrasi ($p < 0.05$). (Lihat tabel Pos Hoc).

Uji lanjutan yang perlu dilakukan adalah Uji korelasi parametric Pearson. Uji korelasi parametric Pearson menunjukkan nilai signifikansi ($P\text{-value}$) = 0.000 ($p < 0.05$) dan koefisien korelasi -0.905. Hal tersebut berarti terdapat korelasi bermakna antara dua variable (konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih terhadap jumlah koloni bakteri *E. coli*). Koefisien korelasi Pearson (r) bernilai negatif berarti korelasinya berbanding terbalik, yang artinya semakin tinggi dosis/konsentrasi ekstrak, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri, serta menunjukkan korelasi yang sangat kuat ($r > 0.799$).

Uji terakhir yang dapat dilakukan adalah Uji Regresi Linier. 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 81.9% ($0.819 \times 100\%$) dari variabel jumlah koloni bakteri dipengaruhi oleh variable independen yakni paparan ekstrak. Dengan kata lain sebanyak 81.9% bakteri mati dikarenakan oleh paparan ekstrak. Persamaan garis regresi menggunakan metode kuadrat terkecil (*least square method*) yang di dapat adalah:

$$y = 12.908 - 1.481x$$

Keterangan: y = jumlah koloni bakteri

x = konsentrasi ekstrak

Penurunan jumlah bakteri *E.coli* dalam penelitian ini diduga karena efek dari senyawa-senyawa kimia aktif yang berasal dari ekstrak etanol kulit kayu kluwih. Kulit kayu kluwih mengandung senyawa-senyawa kimia aktif seperti flavonoid, saponin, dan polifenol. Senyawa-senyawa tersebut memiliki sifat antimikroba dengan mekanisme berbeda-beda.

Flavonoid telah dikenal luas memiliki senyawa antioksidan, antipigmentasi, dan antibakteri poten (Yati dkk, 2007). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut dan dengan dinding bakteri. Kemungkinan lain adalah flavonoid berperan secara langsung dengan mengganggu fungsi sel mikroorganisme dan penghambatan siklus sel mikroba (Fatmawaty *et al.* , 2009)

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit kayu kluwih memiliki efek antibakteri terhadap *E.coli*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih, maka semakin rendah tingkat pertumbuhan *E.coli* yang ditandai dengan jumlah koloni yang semakin sedikit. Dengan demikian, hipotesis penelitian terbukti benar.

BAB 7

KESIMPULAN dan SARAN

7.1 Kesimpulan

7.1.1 Kesimpulan umum :

Tujuan umum diadakannya penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak etanol kulit kayu kluwih memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*. Berdasarkan hasil serangkaian penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit kayu kluwih memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *E. coli*.

7.1.2 Kesimpulan khusus :

1. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol kulit kayu kluwih pada tabung adalah 13% dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak etanol kulit kayu kluwih pada NAP (*Natrium Agar Plate*) adalah 15% dimana pada konsentrasi 15% tidak ada bakteri *E. coli* yang tumbuh pada NAP (*Natrium Agar Plate*).
2. Semakin besar konsentrasi larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih maka semakin sedikit jumlah koloni bakteri *E.coli* yang tumbuh pada media NAP (*Natrium Agar Plate*).
3. Terdapat korelasi bermakna antara dua variable, yaitu konsentrasi ekstrak etanol kulit kayu kluwih terhadap jumlah koloni bakteri *E. coli* (kesimpulan khusus didapat dari hasil penelitian dan analisis data menggunakan uji korelasi parametric Pearson).

7.2 Saran

Perencanaan, proses, dan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu dibutuhkan banyak perbaikan. Perbaikan yang mungkin dapat dilakukan antara lain:

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai ekstrak kulit kayu kluwih, yaitu:
 - a. kandungan larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih secara farmakologis untuk mengetahui zat aktif yang terdapat pada larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih yang mempunyai kemampuan antibakteri serta kadar masing-masing zat aktif tersebut.
 - b. Zat atau kondisi yang menyebabkan ketidaklarutan larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih dalam media pembenihan cair pada metode dilusi tabung.
 - c. Efektivitas larutan ekstrak etanol kulit kayu kluwih terhadap bakteri lain, serta bakteri *E. coli* multiresisten antibiotik dan perbandingan potensi larutan ekstrak terhadap bakteri tersebut dengan *E.coli*
 - d. Efektivitas kulit kayu kluwih yang dibuat menggunakan metode ekstrak dengan pelarut lain atau dengan metode dekok dibandingkan dengan metode ekstrak dengan pelarut etanol yang digunakan dalam penelitian ini.
2. Diperlukan pengukuran standard kekeruhan larutan dengan menggunakan metode dilusi agar untuk memperoleh KHM yang tepat.
3. Diperlukan pengujian efek antibakteri ekstrak etanol kulit kayu kluwih secara *in vivo* untuk mengetahui farmakokinetik, farmakodinamik, dan efek toksik dari bahan-bahan aktif yang terkandung sehingga dapat ditentukan dosis yang aman untuk digunakan manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- 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 S. A. Hal: 511-516.
- Agus, 2007. Ceremai *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels. (online). ([http://agusmp3.multiply.com/journal/item/214/Ceremai_Phyllanthus acidus L. Skeels](http://agusmp3.multiply.com/journal/item/214/Ceremai_Phyllanthus_acidus_L_Skeels)) diakses pada tanggal 13 Desember 2011
- Ahmad, I and Beg, A.Z. Antimicrobial and Phytochemical Studies on 45 Indian Medical Plants Against Multi-Drug Resistant Human Pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001; 74: 113-123.
- Al-Naama, R.T. Evaluation of *in vitro* Inhibitory Effect of Honey on Some Microbial Isolate. *Journal of Bacteriology Research*, 2009; 1(6): 064-067.
- Arsyi, IA. 2008. *Uji aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Dan Arbenan (Duchesnea Indica Andr.Focke) terhadap Staphylococcus aureus dan Pseudomonas Aeroginosa Multiresisten Antibiotik beserta Profil Kromatografi Lapisan Tipisnya*. (online) ([http:// etd.eprints.ums.ac.id](http://etd.eprints.ums.ac.id), diakses tanggal 20 Oktober 2009)
- Anonymous. 2007. *Tanaman Obat Indonesia*, (http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?id=26) diakses pada tanggal 20 Desember 2011
- Anonymous, 2009. *Tanaman Anti Kanker*. (online) (<http://backupccrc.wordpress.com/ensiklopedia/eksiklopedia-tanaman-anti-kanker/c/veremai-phyllanthus-acidus-l-skeels/>)
- Anonymous^d. 2009. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. Iowa State University, (Online), <http://www.cfsph.iastate.edu/msds-ftss/index-eng.php>, accessed 15 November 2011.
- Cheeke. 2000. *Saponin : Suprising Benefits of Desert Plants*. (online), (<http://www.lpi.orego-nstate.edu/sp-spdp/saponin.html>, diakses tanggal 11 November 2011).
- Clark, M. 2005. *E.coli*, (Online), (<http://www.about-ecoli.com>) diakses pada tanggal 14 Desember 2011)
- Clark, M. 2007. *Escherichia coli, Bakteri Berbahaya*. (online). (<http://mikrobia.files.wordpress.com/2008/05/escherichia-coli2.pdf>) diakses pada tanggal 14 Desember 2011
- Dahlan, M. S. 2008. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Dalimarta, S. 2003. *Atlas Tumbuhan Obat*. Puspa Swara Jilid 1-3. Jakarta.
- Dalimartha, S. 2005. *Tanaman Obat di Lingkungan Sekitar*, Puspa Swara, Jakarta, hal 5.
- De Padua, L.S, Bunyaprahastra, Lemmens, J.R. 1999. *Medicinal and Poisonous Plants*. Bogor: Prosea, pp: 286-7.
- Dorland, W.A.N. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*. 29th Ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, p: 607.

- Dzen, S.M., Roekistiningsih, Santoso, S., Winarsih, S. eds. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedia Publishing, p: 197-206.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih.
- Kristio. 2007. *Tanaman Obat Indonesia*, (Online), (http://toiusd.multiply.com/photos/album/56/Kalanchoe_pinnata068114064, diakses 10 November 2011).
- Lacaille-Dubois R. dan H. Wagner. 1996. *A Review of The Biological and Pharmacological activities of saponin*. *Phytomedicine* 2 363-386.
- Lamothe, RG *et al*, 2009. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int. J. Mol. Sci* 10:3400-3419.
- Lanova, 2008. Alkaloid, (online), (<http://hersipa.wordpress.com/alkaloid/>, diakses 18 Desember 2011)
- Lipkin R. 1995. *Scientist Though The Health Benefits of Saponins*. Hal: 11-148.
- 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.
- Naufal, Adib, 2012. [Fito-kimia Komponen Ajaib Cegah PJK, DM dan Kanker](http://my-smartlife.blogspot.com/2012_05_30_archive.html), (online), ([http://my-smartlife.blogspot.com/2012_05_30_archive.html/](http://my-smartlife.blogspot.com/2012_05_30_archive.html), diakses tanggal 19 November 2012).
- Rao A. V. 1996. *Anticarcinogenic properties of plant Saponin*. Second International Symposium on Role of soy. Brussels, Belgium.
- 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 20 Desember 2011)
- Satria. 2008. *Pengertian dan Bentuk Bakteri*. (online), (<http://id.shvoong.com/exact-sciences/biology/2200908-pengertian-dan-bentuk-bakteri/>, diakses pada tanggal 10 November 2011).
- Siregar R F. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Etanol dan Air Rebusan Kulit Batang Ingul (Toona sinesis M.Roem) Terhadap Beberapa Bakteri. Medan: Fakultas Farmasi USU.
- Suwandi, U. 1999. Peran media untuk identifikasi mikroba patogen. Jakarta: Kalbe Farma, (online), (<http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/10PeranMediauntukIdentifikasiMikrob>

[a124.pdf/10PeranMediauntukIdentifikasiMikroba124.html](#), diakses Desember 211)

Sulistiyaningsih, 2008. Potensi Daun Beluntas (*Pluchea indica Less.*) Sebagai Inhibitor Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* Multi Resistant dan Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Ilmu Farmasi Universitas Padjajaran, Bandung.

Tenriugi, A., 2008. Standarisasi Mutu Ekstrak Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* (L.) Medik) Dan Uji Efek Antioksidan dengan Metode DPPH., (online), (<http://pasca.unhas.ac.id/jurnal/files/d1043bce802ee8dbcb6f1dbb5626d55.pdf>). Diakses 12 Oktober 2012)

Tim, C and Andrew J.L. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005: 343-356.

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 18 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 Ethnopharmacology* 50: 27-34. (online), (<http://www.ethnoleaflets.com/leaflets/auricula.htm>) diakses pada tanggal 24 Desember 2011)



LAMPIRAN

LAMPIRAN 1 : PEMBUATAN SEDIAAN EKSTRAK



GAMBAR L 1.1 : Proses Pengeringan

Ekstrak kulit kayu kluwih dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung beberapa hari kemudian dihaluskan / diblender menjadi serbuk.



GAMBAR L 1.2 : Proses ekstraksi

Perendaman 100 gr sampel kering dengan etanol 96% dalam gelas Erlenmeyer sampai volume 900 mL lalu dilanjutkan proses penyaringan.



L 1.3 : Proses Evaporasi

Proses evaporasi untuk memisahkan pelarut etanol dengan zat aktif larutan.

LAMPIRAN 2 : ALAT PENELITIAN UJI ANTIBAKTERI



Gambar L.2.1 : Inkubator (suhu 37°C) dan Alat Uji Efektivitas Antibakteri

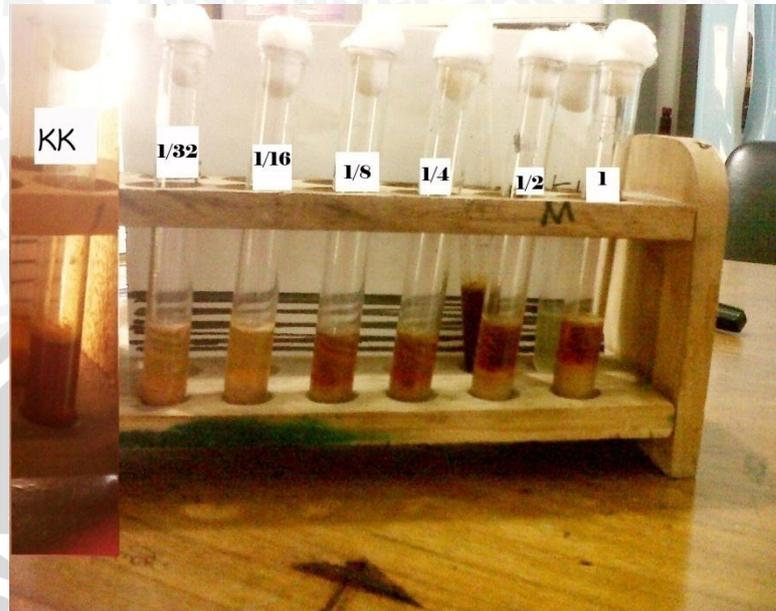


Gambar L.2.2 : Colony Counter Untuk Menghitung Jumlah Koloni dalam Media Agar



Gambar L.2.3 Spektrofotometri Untuk Menstandardisasi McFarland 0.5

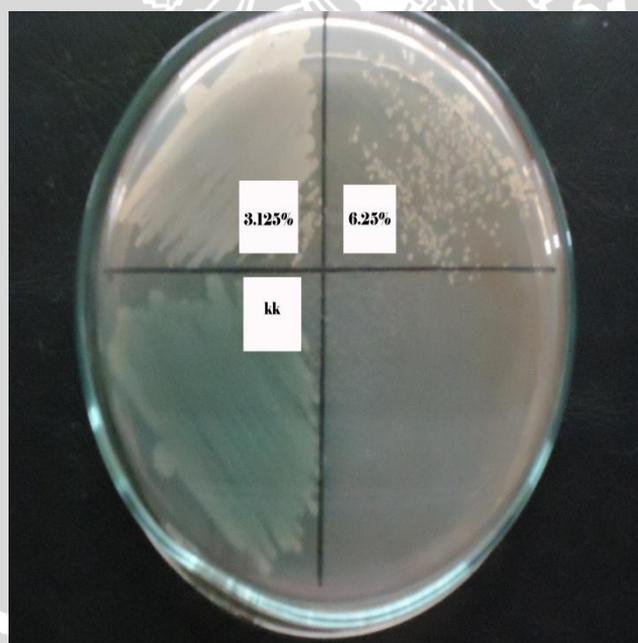
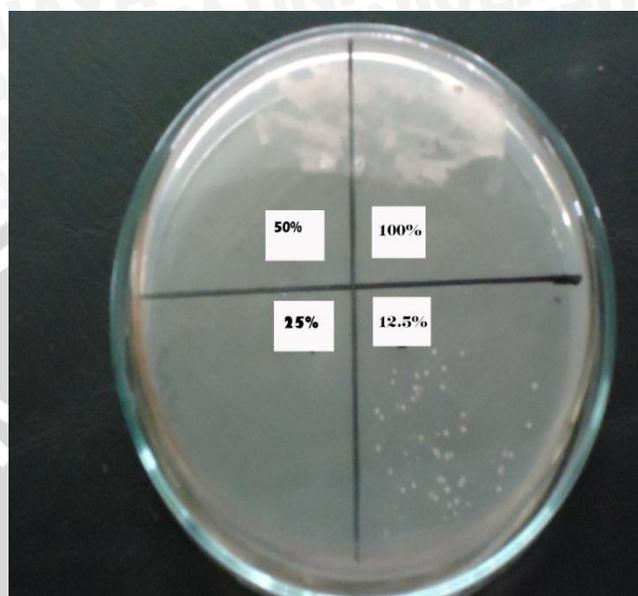
LAMPIRAN 3 : HASIL UJI PENDAHULUAN



LAMPIRAN L 3. 1 Pembuatan berbagai konsentrasi larutan ekstrak kulit kayu kluwih melalui pengenceran serial yaitu 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, yang telah dicampur dengan suspensi bakteri uji *E. coli* dan telah diinkubasi selama 24 jam. Dari gambar tersebut dapat diamati bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin keruh larutan dalam tabung. KHM terdapat pada konsentrasi 12.5%

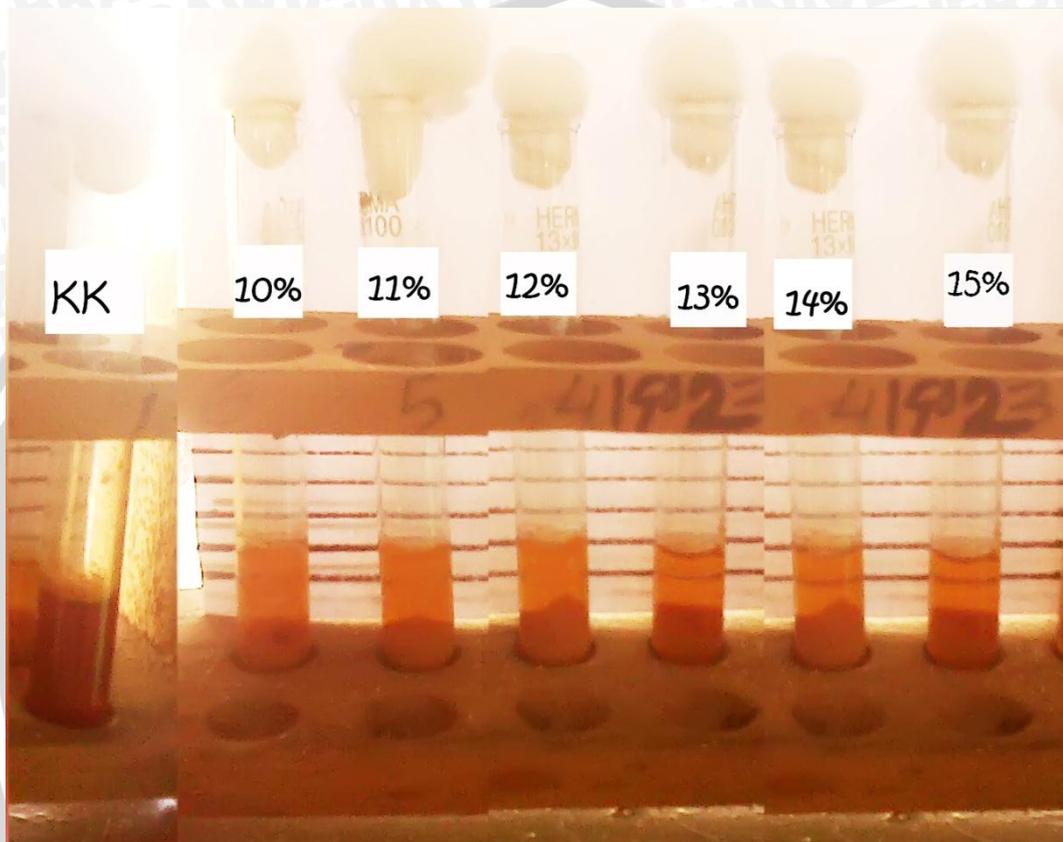
Gambar L 3. 2 Pengamatan KBM pada media NAP (Uji Pendahuluan)

E. coli mulai tidak tumbuh pada konsentrasi 25%

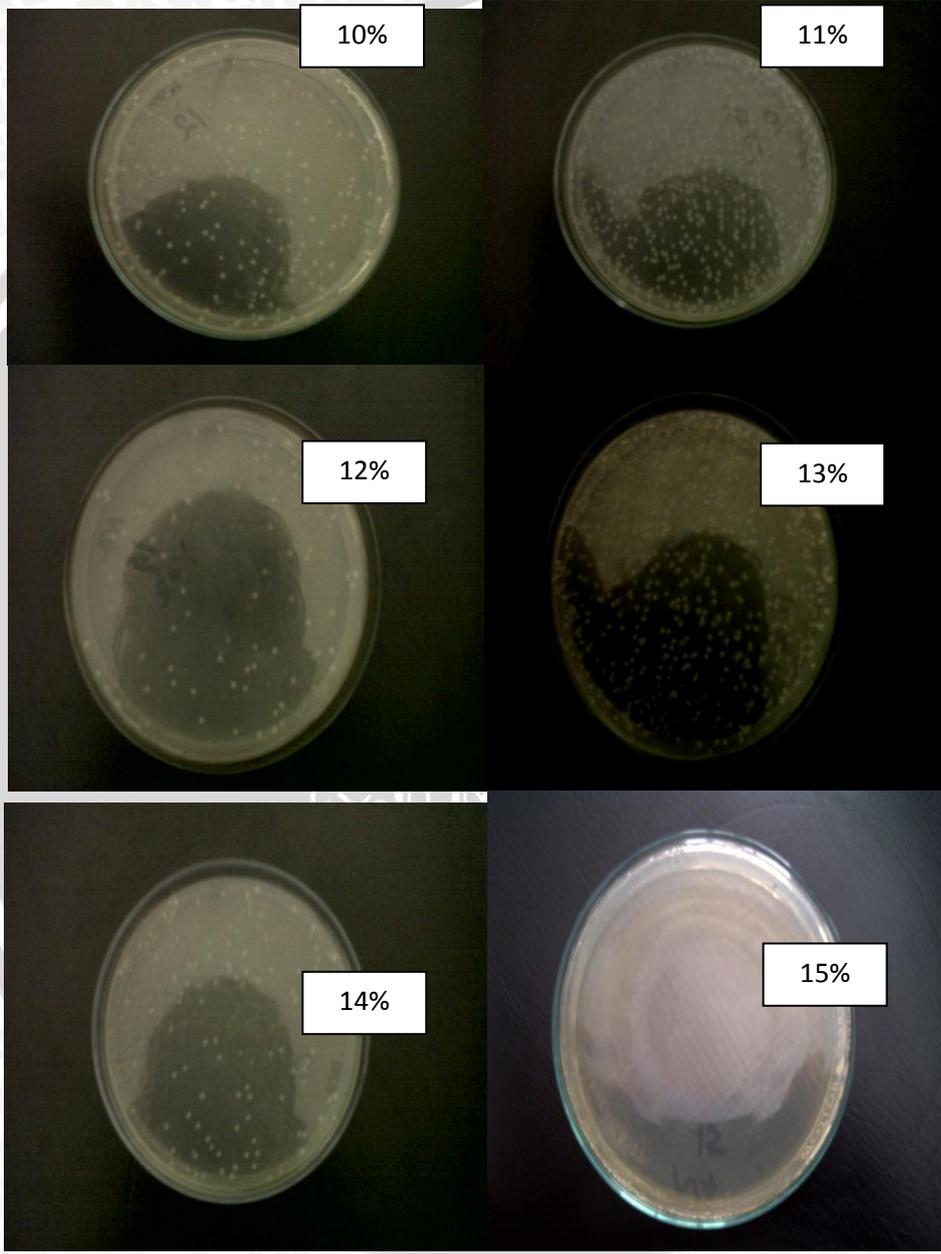


LAMPIRAN 4 : HASIL PENELITIAN

L 4.1 Pengamatan KHM pada tabung



Gambar L 4. 1: 1 Pengamatan KHM pada tabung





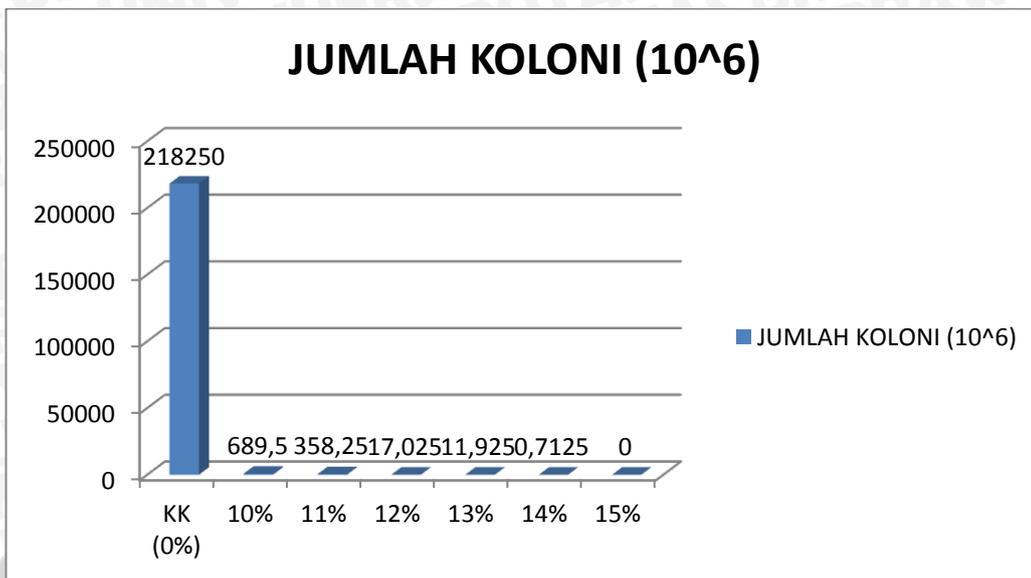
Gambar L 4.1. 2 Hasil Uji Antibakteri pada NAP

LAMPIRAN 5 : HASIL ANALISIS STATISTIK

L 5.1 Tabel jumlah koloni bakteri E. coli pada masing-masing dosis

KONSENTRASI	JUMLAH BAKTERI (X10 ⁶ CFU/PLATE)				RERATA (10 ⁶)	SD (10 ⁶)
	1	2	3	4		
KK (0%)	225000	204000	212000	232000	218250	12606.22
10%	743	697	636	682	689.5	44.10971
11%	372	346	397	318	358.25	33.96444
12%	18.5	19.8	16.1	13.7	17.025	2.694903
13%	12.5	13.3	10.8	11.1	11.925	1.178629
14%	0.56	0.74	0.88	0.67	0.7125	0.134009
15%	0	0	0	0	0	0

Gambar L 5. 2 Diagram Hasil Penghitungan Jumlah Koloni pada Berbagai Konsentrasi dari Masing-masing Pengulangan



L 5. 3 UJI NORMALITAS KOLMOGOROV SMIRNOV JUMLAH KOLONI BAKTERI

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		koloni
N		28
Normal Parameters ^a	Mean	3.13E10
	Std. Deviation	7.782E10
Most Extreme Differences	Absolute	.510
	Positive	.510
	Negative	-.344
Kolmogorov-Smirnov Z		2.699
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000

a. Test distribution is Normal.

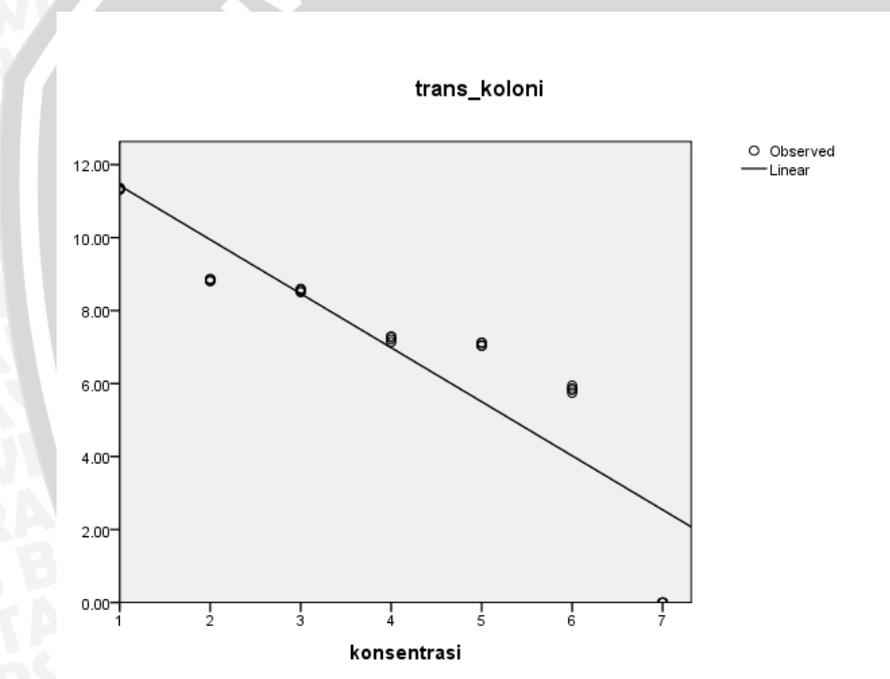
UJI NORMALITAS DATA TRANSFORMASI JUMLAH KOLONI

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test



		trans_koloni
N		28
Normal Parameters ^a	Mean	6.9830
	Std. Deviation	3.33351
Most Extreme Differences	Absolute	.220
	Positive	.143
	Negative	-.220
Kolmogorov-Smirnov Z		1.166
Asymp. Sig. (2-tailed)		.132

a. Test distribution is Normal.



L 5.4 UJI HOMOGENITAS VARIAN DATA JUMLAH KOLONI

Test of Homogeneity of Variances

koloni

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
22.270	6	21	.000



UJI HOMOGENITAS VARIAN DATA TRANSFORMASI JUMLAH KOLONI

Test of Homogeneity of Variances

trans_koloni

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.389	6	21	.067

L 5.5 Uji Analisis of Variance (ANOVA)

Descriptives

koloni	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0% (KK)	4	2.18E11	1.261E10	6.303E9	1.98E11	2.38E11	2.E11	2.E11
10%	4	6.90E8	4.411E7	2.205E7	6.19E8	7.60E8	6.E8	7.E8
11%	4	3.58E8	3.396E7	1.698E7	3.04E8	4.12E8	3.E8	4.E8
12%	4	1.70E7	2694902.596	1.347E6	12736808.60	21313191.40	1.E7	2.E7
13%	4	1.20E7	1257974.563	6.290E5	10023281.75	14026718.25	1.E7	1.E7
14%	4	7.12E5	134008.706	6.700E4	499262.24	925737.76	560000	880000
15	4	.00	.000	.000	.00	.00	0	0
Total	28	3.13E10	7.782E10	1.471E10	1.16E9	6.15E10	0	2.E11



UJI ONE WAY ANOVA

ANOVA

trans_koloni	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	299.982	6	49.997	2.066E4	.000
Within Groups	.051	21	.002		
Total	300.033	27			

UJI MULTI KOMPARASI POS HOC TUKEY

Multiple Comparisons

trans_koloni

Tukey HSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0% (KK)	10%	2.50054*	.03479	.000	2.3875	2.6136
	11%	2.78570*	.03479	.000	2.6726	2.8988
	12%	4.11156*	.03479	.000	3.9985	4.2246
	13%	4.26011*	.03479	.000	4.1470	4.3732
	14%	5.49141*	.03479	.000	5.3783	5.6045
	15	11.33841*	.03479	.000	11.2253	11.4515
10%	0% (KK)	-2.50054*	.03479	.000	-2.6136	-2.3875
	11%	.28516*	.03479	.000	.1721	.3982
	12%	1.61102*	.03479	.000	1.4979	1.7241
	13%	1.75957*	.03479	.000	1.6465	1.8726
	14%	2.99087*	.03479	.000	2.8778	3.1040
	15	8.83787*	.03479	.000	8.7248	8.9509
11%	0% (KK)	-2.78570*	.03479	.000	-2.8988	-2.6726
	10%	-.28516*	.03479	.000	-.3982	-.1721
	12%	1.32586*	.03479	.000	1.2128	1.4389
	13%	1.47441*	.03479	.000	1.3613	1.5875



	14%	2.70571*	.03479	.000	2.5926	2.8188
	15	8.55271*	.03479	.000	8.4396	8.6658
12%	0% (KK)	-4.11156*	.03479	.000	-4.2246	-3.9985
	10%	-1.61102*	.03479	.000	-1.7241	-1.4979
	11%	-1.32586*	.03479	.000	-1.4389	-1.2128
	13%	.14855*	.03479	.005	.0355	.2616
	14%	1.37985*	.03479	.000	1.2668	1.4929
	15	7.22685*	.03479	.000	7.1138	7.3399
13%	0% (KK)	-4.26011*	.03479	.000	-4.3732	-4.1470
	10%	-1.75957*	.03479	.000	-1.8726	-1.6465
	11%	-1.47441*	.03479	.000	-1.5875	-1.3613
	12%	-.14855*	.03479	.005	-.2616	-.0355
	14%	1.23130*	.03479	.000	1.1182	1.3444
	15	7.07830*	.03479	.000	6.9652	7.1914
14%	0% (KK)	-5.49141*	.03479	.000	-5.6045	-5.3783
	10%	-2.99087*	.03479	.000	-3.1040	-2.8778
	11%	-2.70571*	.03479	.000	-2.8188	-2.5926
	12%	-1.37985*	.03479	.000	-1.4929	-1.2668
	13%	-1.23130*	.03479	.000	-1.3444	-1.1182
	15	5.84699*	.03479	.000	5.7339	5.9601
15	0% (KK)	-11.33841*	.03479	.000	-11.4515	-11.2253
	10%	-8.83787*	.03479	.000	-8.9509	-8.7248
	11%	-8.55271*	.03479	.000	-8.6658	-8.4396
	12%	-7.22685*	.03479	.000	-7.3399	-7.1138
	13%	-7.07830*	.03479	.000	-7.1914	-6.9652
	14%	-5.84699*	.03479	.000	-5.9601	-5.7339

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Perbandingan antar perlakuan	Dosis	Sig.	Keputusan
0% (KK)	10%	.000	Berbeda Signifikan
	11%	.000	Berbeda Signifikan
	12%	.000	Berbeda Signifikan
	13%	.000	Berbeda Signifikan
	14%	.000	Berbeda Signifikan
10%	15%	.000	Berbeda Signifikan
	0%	.000	
	10%	.000	Berbeda Signifikan
	11%	.000	Berbeda Signifikan
	12%	.000	Berbeda Signifikan
11%	13%	.000	Berbeda Signifikan
	14%	.000	Berbeda Signifikan
	15%	.000	Berbeda Signifikan
	0%	.000	Berbeda Signifikan
	10%	.000	Berbeda Signifikan
12%	12%	.000	Berbeda Signifikan
	13%	.000	Berbeda Signifikan
	14%	.000	Berbeda Signifikan
	15%	.000	Berbeda Signifikan
	0%	.000	Berbeda Signifikan
13%	10%	.000	Berbeda Signifikan
	11%	.000	Berbeda Signifikan
	13%	.005	Berbeda Signifikan



	14%	.000	Berbeda Signifikan
	15%	.000	Berbeda Signifikan
13%	0%	.000	Berbeda Signifikan
	10%	.000	Berbeda Signifikan
	11%	.000	Berbeda Signifikan
	12%	.005	Berbeda Signifikan
	14%	.000	Berbeda Signifikan
	15%	.000	Berbeda Signifikan
14%	0%	.000	Berbeda Signifikan
	10%	.000	Berbeda Signifikan
	11%	.000	Berbeda Signifikan
	12%	.000	Berbeda Signifikan
	13%	.000	Berbeda Signifikan
	15%	.000	Berbeda Signifikan
15%	0%	.000	Berbeda Signifikan
	10%	.000	Berbeda Signifikan
	11%	.000	Berbeda Signifikan
	12%	.000	Berbeda Signifikan
	13%	.000	Berbeda Signifikan
	14%	.000	Berbeda Signifikan

*The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogenous Subsets



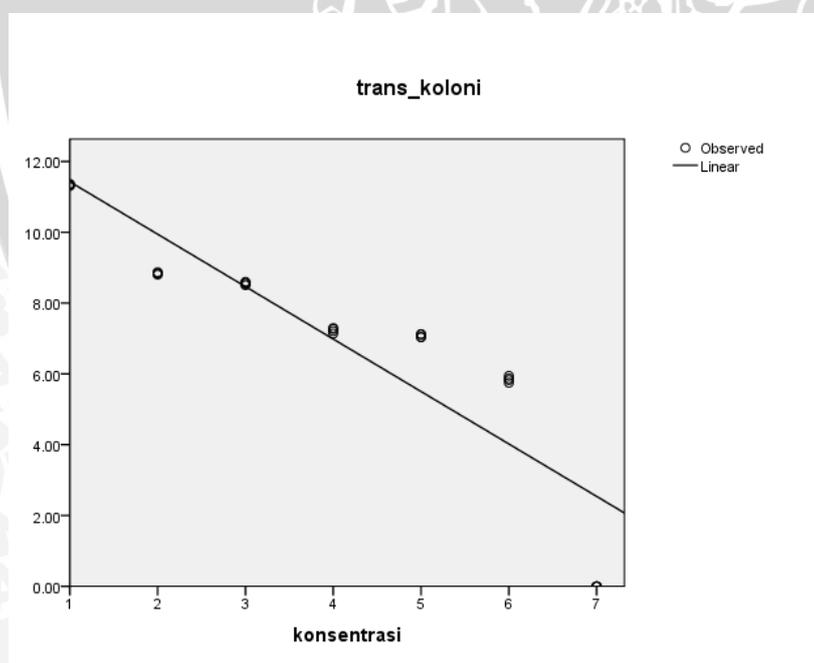
trans_koloni

Tukey HSD

konsentras i	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
15	4	.0000						
14%	4		5.8470					
13%	4			7.0783				
12%	4				7.2268			
11%	4					8.5527		
10%	4						8.8379	
0% (KK)	4							11.3384
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Means Plots



L 5. 6 Uji Korelasi Pearson



Correlations

		konsentrasi	trans_koloni
konsentrasi	Pearson Correlation	1	-.905**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	28	28
trans_koloni	Pearson Correlation	-.905**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	28	28

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

UJI REGRESI LINIER

Regression

Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	konsentrasi ^a		. Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: trans_koloni

Coefficients

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	12.908	.611		21.129	.000
	konsentrasi	-1.481	.137	-.905	-10.843	.000

a. Dependent Variable: trans_koloni

Model Summary



Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.905 ^a	.819	.812	1.44563

a. Predictors: (Constant), konsentrasi

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	245.697	1	245.697	117.567	.000 ^a
	Residual	54.336	26	2.090		
	Total	300.033	27			

a. Predictors: (Constant), konsentrasi

b. Dependent Variable: trans_koloni

Coefficients

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	12.908	.611		21.129	.000
	konsentrasi	-1.481	.137	-.905	-10.843	.000

a. Dependent Variable: trans_koloni