

PERBANDINGAN DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* SECARA *In Vitro*

SKRIPSI

Oleh
ALFAN TAMMI
1218011009



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRACT

COMPARISON INHIBITION BAY LEAF EXTRACT (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) ON THE GROWTH OF *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli* BACTERIA *In Vitro*

By

ALFAN TAMMI

Backgrounds: *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are a bacteria that act as normal flora in the body. If it exceeds a certain limit, the bacteria may be pathogenic. Bay leaf contain active compounds with antibacterial effects are: tannins, flavonoids, essential oils, and alkaloids. The purpose of this study was to determine differences in inhibition that produced by bay leaf extract on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Methods: This research was a experimental laboratoric with kirby bauer disc diffusion method. Samples were *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Bay leaf extract concentration were: 20%, 40%, 60%, 80% and 100% . Inhibition obtained by measuring inhibition zone formed around the paper discs using a caliper. Statistical analyzes were performed using the Mann-Whitney test.

Results: Bay leaf extract created inhibition zone for *Staphylococcus aureus* at concentration of 20% (18.75 mm); 40% (20 mm); 60% (20 mm); 80% (20.25 mm); 100% (22.75 mm) and for *Escherichia coli*, inhibition at each level were not found. The results of statistical analysis showed a significant difference of each concentration.

Conclusions: Bay leaf extract can inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*. However, it was still ineffective to inhibit *Escherichia coli* as there was no inhibition zone.

Key words: bay leave extract, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRAK

PERBANDINGAN DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* SECARA *In Vitro*

Oleh

ALFAN TAMMI

Latar Belakang: *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* merupakan bakteri yang berperan sebagai flora normal di tubuh manusia. Jika melebihi batas tertentu, kedua bakteri ini dapat menjadi patogen. Daun salam mempunyai zat aktif dengan efek antibakteri yaitu: tanin, flavonoid, minyak atsiri, dan alkaloid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan daya hambat yang dihasilkan ekstrak daun salam terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

Metode Penelitian: Jenis penelitian ini adalah eksperimen laboratorium dengan metode difusi cakram kirby bauer. Sampel penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Kadar ekstrak daun salam yaitu: 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Daya hambat diperoleh berdasarkan pengukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong. Analisis statistik yang dilakukan menggunakan uji Mann-Whitney.

Hasil Penelitian: Ekstrak daun salam menghasilkan zona hambat untuk *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 20% (18,75 mm); 40% (20 mm); 60% (20 mm); 80% (20,25 mm); 100% (22,75 mm) dan untuk *Escherichia coli*, tidak ditemukan daya hambat pada masing-masing kadar. Pada hasil analisa statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dari masing-masing konsentrasi.

Simpulan Penelitian: Ekstrak daun salam dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Akan tetapi, masih belum efektif untuk menghambat *Escherichia coli* karena tidak ditemukannya zona hambat.

Kata kunci: ekstrak daun salam, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

PERBANDINGAN DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* SECARA *In Vitro*

SKRIPSI

**Oleh
ALFAN TAMMI**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar
SARJANA KEDOKTERAN**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

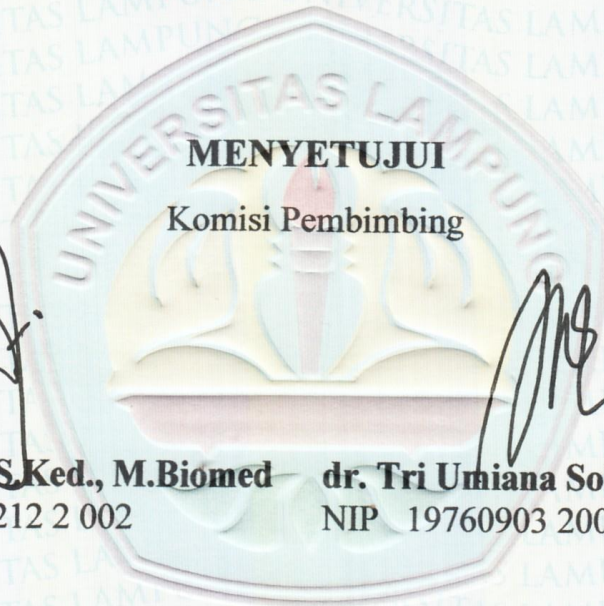
Judul Skripsi : **PERBANDINGAN DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN
SALAM (*Syzygium polyanthum* [Weight.] Walp.)
TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus
aureus* DAN *Escherichia coli* SECARA *In Vitro***

Nama Mahasiswa : **Alfan Tammi**

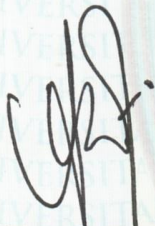
No. Pokok Mahasiswa : 1218011009

Program Studi : Pendidikan Dokter

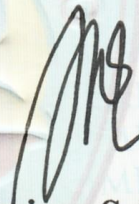
Fakultas : Kedokteran



MENYETUJUI
Komisi Pembimbing



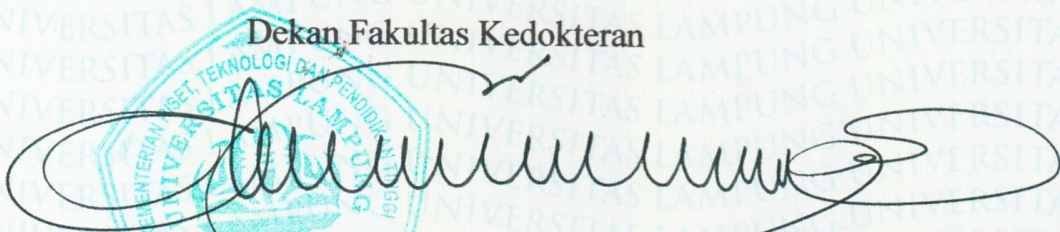
dr. Ety Apriliana, S.Ked., M.Biomed
NIP 19780429 200212 2 002



dr. Tri Umiana Soleha, S.Ked., M.Kes
NIP 19760903 200501 2 001

MENGETAHUI

Dekan Fakultas Kedokteran

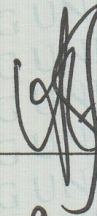


Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA
NIP 19701208 200112 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : dr. Ety Apriliana, S.Ked., M.Biomed

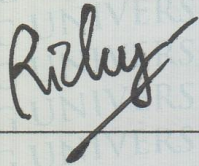


Sekretaris : dr. Tri Umiana Soleha, S.Ked., M.Kes



Penguji

Bukan Pembimbing : dr. M. Ricky Ramadhian, S.Ked., M.Sc



2. Dekan Fakultas Kedokteran

Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M.Kes., Sp.PA

NIP 19701208 200112 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 26 Februari 2016



LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul **“PERBANDINGAN DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* SECARA *In Vitro*”** adalah hasil karya saya sendiri dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai tata etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Hak intelektualitas atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung

Atas pernyataan ini, apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya.

Bandar Lampung, 25 Maret 2016

Pembuat pernyataan,



Alfan Tammi

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, Lampung Selatan pada tanggal 29 Desember 1994, sebagai anak kedua dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Dr. Ir. Tamrin, M.S. dan Ibu Emi Asmawati, S.Pd.

Pendidikan penulis dimulai dari TK PTPN 7 Pewa Natar (1999-2000), Sekolah Dasar di SDN 4 Lampung Selatan (2000-2001) dan SD Al-Kautsar (2001-2006), Sekolah Menengah Pertama di Al-Kautsar (2006-2009), dan Sekolah Menengah Atas di Al-Kautsar (2009-2012).

Pada tahun 2012, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung, Penulis pernah menjabat sebagai anggota FSI Ibnu Sina sebagai ketua Biro DANUS. Penyusunan skripsi merupakan tugas akhir sebelum penulis mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran dan melanjutkan Pendidikan Profesi.

فِيمَا رَحْمَةٍ مِّنَ

اللَّهِ لِنْتَ لَهُمْ وَلَوْ كُنْتَ فَظًّا غَلِيظَ الْقَلْبِ لَانْفَضُّوا مِنْ حَوْلِكَ
فَاعْفُ عَنْهُمْ وَاسْتَغْفِرْ لَهُمْ وَشَاوِرْهُمْ فِي الْأَمْرِ فَإِذَا عَزَمْتَ
فَتَوَكَّلْ عَلَى اللَّهِ إِنَّ اللَّهَ يُحِبُّ الْمُتَوَكِّلِينَ

“Maka disebabkan rahmat dari Allah-lah kamu berlaku lemah lembut terhadap mereka. Sekiranya kamu bersikap keras lagi berhati kasar, tentulah mereka menjauhkan diri dari sekelilingmu. Karena itu ma'afkanlah mereka, mohonkanlah ampun bagi mereka, dan bermusyawaratlah dengan mereka dalam urusan itu . Kemudian apabila kamu telah membulatkan tekad, maka bertawakkallah kepada Allah. Sesungguhnya Allah menyukai orang-orang yang bertawakkal kepada-Nya.”

(Q.S Ali Imran ayat 159)

Skripsi ini saya persembahkan untuk

Papa, Mama, dan Kakak

*Terimakasih untuk semua doa dan
dukungan yang telah diberikan
selama ini*

SANWACANA

Segala puji dan syukur kepada Allah Subhanahu wa Ta'ala, Tiada Tuhan selain DIA, Tuhan Yang Maha Segalanya, Pemilik segala puja dan puji, dan DIA lah Yang Maha Berkehendak atas segala sesuatu yang terjadi di jagat raya ini. Dan berkat kasih sayang, pertolongan dan kehendak-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

Skripsi berjudul "PERBANDINGAN DAYA HAMBAT EKSTRAK DAUN SALAM (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli* SECARA *In Vitro*" ini disusun merupakan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.

Sebuah karya kecil yang merupakan bagian dari perjalanan hidup saya, sebuah karya yang saya dedikasikan dan persembahkan untuk semua pihak yang telah berperan atas dorongan, bantuan, saran, kritik dan bimbingan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan antara lain kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Hasriadi Mat Akin, M.P, selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Dr. dr. Muhartono, S. Ked., M.Kes, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
3. dr. Ety Apriliana, M. Biomed, selaku Pembimbing Pertama atas semua bantuan, saran, bimbingan dan pengarahan yang sangat luar biasa ditengah kesibukan beliau, beliau tetap ada untuk membantu dalam penyusunan skripsi ini dan juga selaku pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama proses perkuliahan.

4. dr. Tri Umiana Soleha, M.Kes., selaku Pembimbing Kedua atas kesediaannya membimbing dan selalu memberikan semangat, saran dan nasehat untuk mengerjakan skripsi ini.
5. dr. M. Ricky Ramadhian, M. Sc, selaku pembahas yang telah memberikan banyak masukan untuk skripsi ini.
6. Bapak dan Ibu Staff Administrasi serta seluruh *civitas akademik* Fakultas Kedokteran Unila, terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya selama ini.
7. Kedua orangtua-ku, Bapak Dr. Ir. Tamrin, MS. dan Ibu Emi Asmawati, S.Pd.
Papa, Mama. Terima kasih atas *support*, kasih sayang, bimbingan, dan doa-doanya selama ini kepada penulis selama ini.
8. Kakakku, Ryana Tammi Putri yang sekarang sedang menempuh kuliahnya di ITB, cepet lulus ya kak, ditunggu kepulangannya di Lampung.
9. Team Skripsi, Alexander Dicky dan Siti Aminah Hasibuan, yang membantu mendorong penulis untuk melakukan penelitian dan juga terimakasih atas bantuan dalam penulisan skripsi, kalau tidak ada kalian skripsi ini tidak akan mulai. Terimakasih banyak.
10. Bro-bro seperjuangan, Kouma Al-Korma (Andhika Rajanur H.) dan Agam Anggoro, atas tempat kosan yang sering penulis datangi, tidur, dan makan disana. Terimakasih juga atas bantuannya membeli makanan yang berat walau masih setengah tidur.
11. Teman-teman seangkatan, Leo, Dwi, Reza, Redo, Santos, Rois, Toper, dan lain-lain. Terimakasih atas kebersamaannya selama di FK.
12. Serta semua orang yang tidak saya sebutkan satu-persatu, saya mohon maaf, dan terima kasih banyak ikut mendoakan dan menyemangati saya dalam mengerjakan skripsi ini.

Bandar Lampung, Maret 2016

ALFAN TAMMI

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Ilmu Pengetahuan	4
1.4.2 Peneliti	4
1.4.3 Masyarakat	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.1 Klasifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.2 Tempat Hidup Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.3 Patogenesis Infeksi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.1.4 Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2 Bakteri <i>Escherichia coli</i>	9
2.3 Tanaman Salam (<i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.] Walp.)	13
2.3.1 Penamaan dan Klasifikasi Salam (<i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.] Walp.)	14
2.3.2 Kandungan dan Manfaat Daun Salam <i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.] Walp	14
2.4 Uji Sensitivitas Antibakteri (<i>Disc Diffusion Testing</i>)	16
2.4.1 Pemilihan Koloni	16
2.4.2 Persiapan Suspensi Bakteri	17

2.4.3	Persiapan Wadah Inokulum	17
2.4.4	Inokulasi Wadah	18
2.4.5	Penempatan <i>Antimicrobial Disc</i>	18
2.4.6	Pengukuran Zona Hambat	19
2.5	Kerangka Teori	19
2.6	Kerangka Konsep	21
2.7	Hipotesis Penelitian	22

III. METODE PENELITIAN

3.1	Desain Penelitian	23
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian	23
3.2.1	Tempat Penelitian	23
3.2.2	Waktu Penelitian	23
3.3	Bahan Uji dan Bakteri Uji	24
3.3.1	Bahan Uji	24
3.3.2	Bakteri Uji	24
3.3.3	Media Kultur	25
3.4	Identifikasi Variabel	25
3.4.1	Variabel Dependen	25
3.4.2	Variabel Independen	25
3.5	Definisi Operasional	26
3.6	Besar Sampel	27
3.7	Prosedur Penelitian	27
3.7.1	Persiapan	28
3.7.1.1	Alat Penelitian	28
3.7.1.2	Bahan Penelitian	28
3.7.2	Sterilisasi Alat	29
3.7.3	Pembuatan Ekstrak Daun Salam	29
3.7.4	Identifikasi Uji Bakteri	30
3.7.5	Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan <i>McFarland</i>	36
3.7.6	Teknik Pembuatan Suspensi Bakteri	36
3.7.7	Teknik Pembuatan Media Agar MHA (<i>Muller Hinton Agar</i>)	37
3.7.8	Uji Daya Hambat <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i> dengan Metode Difusi Kirby Bauer	37
3.8	Pengolahan dan Analisis Data	40
3.8.1	Pengolahan Data	40
3.8.2	Analisis Data	40

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian	42
4.1.1 Hasil Kultur dan Pewarnaan Gram Bakteri Uji	42
4.1.2 Hasil Uji Biokimiawi Bakteri Uji	43
4.1.3 Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Salam <i>Syzygium</i>	
4.1.4 <i>polyanthum</i> [Wight.] Walp.	44
4.1.3.1 Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun	
Salam <i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.]	
Walp. terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.1.3.2 Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun	
Salam <i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.]	
Walp. terhadap <i>Escherichia coli</i>	45
4.2 Hasil Analisis Data	46
4.3 Pembahasan	47
V. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	53
5.2. Saran	53
5.2.1 Peneliti Lain	53
5.2.2 Masyarakat	54

DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri.....	19
2. Definisi operasional variabel dependen dan independen penelitian.....	26
3. Hasil isolasi dan pewarnaan gram ulang bakteri uji.....	42
4. Hasil uji biokimiawi ulang bakteri uji.....	43
5. Zona hambat <i>Staphylococcus aureus</i>	44
6. Zona hambat <i>Escherichia coli</i>	45
7. Hasil uji <i>Mann-Whitney</i> pada daya hambat ekstrak daun salam terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i>	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Staphylococcus aureus</i> pembesaran x1000.....	5
2. <i>Escherichia coli</i> pembesaran x1000.....	9
3. <i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.] Walp.....	13
4. Kerangka teori penelitian.....	21
5. Kerangka konsep penelitian.....	21
6. Daun salam (<i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.] Walp.).....	24
7. Diagram alur penelitian identifikasi bakteri.....	32
8. Diagram alur penelitian identifikasi bakteri gram positif.....	32
9. Diagram alur penelitian identifikasi bakteri gram negatif.....	33
10. Diagram alur tes biokimawi gram negatif dengan uji TSIA.....	34
11. Diagram alur tes biokimiawi bakteri gram negatif dengan uji sitrat.....	35
12. Diagram alur kerja penelitian.....	39

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang penting, khususnya di negara berkembang. Salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut adalah antimikroba antara lain antibakteri/antibiotik, antijamur, antivirus, dan antiprotozoa. Antibiotik merupakan obat yang digunakan pada infeksi yang disebabkan oleh bakteri (Kemenkes, 2011).

Berbagai studi menemukan bahwa sekitar 40-62% antibiotik digunakan secara tidak tepat yaitu untuk penyakit-penyakit yang sebenarnya tidak memerlukan antibiotik. Pada penelitian kualitatif, penggunaan antibiotik diberbagai bagian rumah sakit ditemukan 30% sampai dengan 80% tidak didasarkan pada indikasi. Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi menimbulkan berbagai permasalahan dan merupakan ancaman global bagi kesehatan terutama resistensi bakteri terhadap antibiotik. Pada awalnya resistensi terjadi di tingkat rumah sakit, tetapi lambat laun juga berkembang dilingkungan masyarakat, khususnya pada bakteri *Streptococcus pneumoniae* (SP), *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* (Kemenkes, 2011).

Salah satu bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang dapat ditemukan dimana saja termasuk pada tubuh manusia. Pada tubuh manusia, jika bakteri ini dalam jumlah normal maka tidak berpotensi menimbulkan penyakit. Akan tetapi, bakteri *Staphylococcus aureus* sering menimbulkan bakterimia dan menjadi bakteri patogen pada manusia. Bakteremia yang disebabkan *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan berbagai macam penyakit berbahaya dikarenakan bakteri ini memiliki faktor virulensi yang bervariasi (Madigan *et al.*, 2012).

Bakteri selain *Staphylococcus aureus* yang sering menyebabkan penyakit tubuh manusia adalah *Escherichia coli*. *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang menjadi flora normal di dalam usus manusia. Di dalam usus, bakteri ini berfungsi menguraikan sisa-sisa makanan. Bakteri *Escherichia coli* dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare (Warsa, 1994).

Indonesia memiliki beberapa tumbuhan yang digunakan sebagai rempah-rempah, salah satunya adalah Salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.). Daun dari tumbuhan ini digunakan sebagai pelengkap bumbu dapur, kulit pohonnya dapat digunakan sebagai bahan pewarna jala atau anyaman bambu, dan buahnya dapat dimakan. Akan tetapi, manfaat dari tumbuhan salam tidak hanya untuk menjadi bumbu dapur saja, melainkan tumbuhan ini memiliki khasiat untuk pengobatan. Masyarakat Indonesia menggunakan daun salam untuk mengobati kolesterol tinggi, hipertensi, kencing manis, maag, dan diare (Dalimartha, 2000). Khasiat daun salam telah dibuktikan oleh

penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya dan hasilnya daun salam memiliki zat-zat yang berguna untuk antikolesterol, antihipertensi, antiglikemik, dan antibiotik (Lajuck, 2012; Widyawati *et al.*, 2015).

Di Indonesia, tumbuhan salam tersedia dalam jumlah banyak dan mudah didapat. Selain itu, daun salam terbukti memiliki kemampuan antibiotik. Maka dari itu, berdasarkan latar belakang diatas, maka peneliti akan melakukan penelitian mengenai daya hambat ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Perumusan masalah yang dapat diambil adalah apakah ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui daya hambat ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah mengetahui perbedaan zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Ilmu Pengetahuan

Penelitian ini dapat berkontribusi bagi ilmu kesehatan khususnya mengenai daya hambat ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*.

1.4.2 Peneliti

Penelitian ini dapat menambah wawasan peneliti dalam bidang mikrobiologi kedokteran.

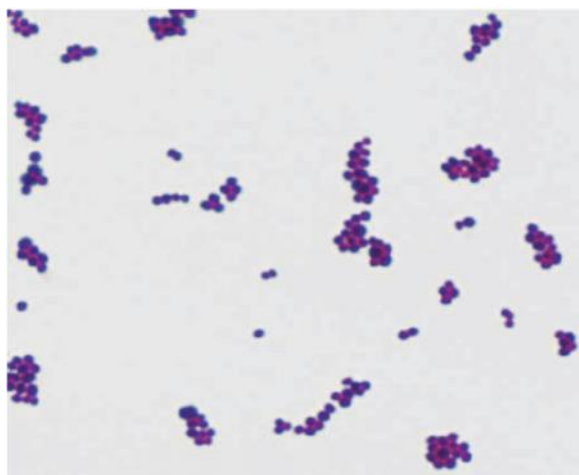
1.4.3 Masyarakat

Hasil penelitian ini dapat digunakan masyarakat dalam pengobatan menggunakan daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.).

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) adalah bakteri gram positif yang menghasilkan pigmen kuning, bersifat aerob fakultatif, tidak menghasilkan spora dan tidak motil, umumnya tumbuh berpasangan maupun berkelompok, dengan diameter sekitar 0,5-1,5 μm . Bakteri ini tahan terhadap pengeringan dan dapat mentoleransi garam konsentrasi tinggi (NaCl 10%) bila ditanam pada media buatan. Walaupun pada manusia *S. aureus* adalah flora normal, bakteri ini tetap menjadi patogen yang potensial (Madigan *et al.*, 2012).



Gambar 1. *Staphylococcus aureus* pembesaran x1000 (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.1 Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Stafilokokus berasal dari kata *staphyle* yang berarti kelompok buah anggur dan *coccus* yang berarti benih bulat. *Aureus* berasal dari kata *aurum* yang berarti emas. *Staphylococcus aureus* memiliki klasifikasi sebagai berikut (Hill, 1981).

Kingdom : *Bacteria*
Filum : *Firmicutes*
Kelas : *Bacilli*
Ordo : *Bacillales*
Famili : *Staphylococcaceae*
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*

2.1.2 Tempat Hidup Bakteri *Staphylococcus aureus*

Batas-batas suhu untuk pertumbuhan *Staphylococcus sp.* adalah 15°C dan 40°C dengan suhu optimum 37°C. Bakteri ini tumbuh optimal dalam suasana aerob dan pH optimum adalah 7,4. Pada lempeng agar, koloni berbentuk bulat, diameter 1-2mm, cembung, buram, mengkilat, dan konsistensi lunak. Warna khasnya adalah kuning keemasan dengan intensitas warna bervariasi. Pada lempeng agar darah umumnya koloni lebih besar dan pada varietas tertentu koloninya dikelilingi zona hemodialisis (Warsa, 1994).

2.1.3 Patogenesis Infeksi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus sp.* merupakan sebagian dari flora normal pada kulit manusia, saluran pernafasan dan pada pencernaan manusia. Bakteri ini juga terdapat di udara dan lingkungan. Patogenesisnya adalah efek gabungan dari metabolit yang dihasilkannya. Bakteri paling patogen dari *Staphylococcus sp.* adalah *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* bersifat invasif, penyebab hemolisis, membentuk koagulase, mencairkan gelatin, membentuk pigmen kuning emas dan meragi manitol. Bakteri ini dapat menyebabkan sistitis, pielitis, meningitis, septikemia, endokarditis, osteomielitis, dan lain-lain. Peradangan setempat merupakan sifat khas infeksi bakteri ini. Bakteri ini akan menyebar melalui pembuluh getah bening dan pembuluh darah sehingga sering terjadi peradangan vena dan trombosis (Warsa, 1994).

2.1.4 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus tergolong ke dalam bakteri gram positif. Bakteri gram positif memiliki selubung sel yang terdiri atas membran sel dan lapisan peptidoglikan yang tebal (dinding sel). Pewarnaan pada lapisan peptidoglikan lebih dapat mempertahankan warnanya saat dibilas dengan alkohol sehingga bakteri gram positif mampu mempertahankan kristal violet. Hal ini memberikan warna ungu atau biru pada bakteri gram positif (Jawetz *et al.*, 2012).

Bakteri gram positif yang memiliki bentuk bulat yang mirip dengan *Staphylococcus sp.* adalah *Streptococcus sp.* Uji biokimia diperlukan untuk membedakan kedua bakteri tersebut. Uji katalase dilakukan untuk membedakan antara bakteri *Staphylococcus sp.* dengan bakteri *Streptococcus sp.* Uji biokimiawi ini didasari oleh pembentukan enzim katalase yang dapat menguraikan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen. *Staphylococcus sp.* dapat memproduksi enzim katalase sedangkan *Streptococcus sp.* tidak dapat memproduksi enzim tersebut (Jawetz *et al.*, 2012).

Staphylococcus sp. memiliki beberapa spesies berbeda dan yang memiliki kepentingan klinis yaitu *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Staphylococcus saprophyticus*. Perbedaan *Staphylococcus aureus* dari bakteri-bakteri *Staphylococcus* lainnya adalah *Staphylococcus aureus* bersifat koagulase positif. Tes untuk mengidentifikasi sifat koagulase positif salah satunya adalah dengan tes slide koagulase. Tes ini menggunakan salin atau yang lebih baik menggunakan plasma kelinci dengan antikoagulasi EDTA. Cairan tersebut ditetaskan pada kaca objek dan diberikan bakteri yang akan diuji. Hasil positif menunjukkan gumpalan-gumpalan pada kaca objek setelah diberikan *Staphylococcus aureus* (Jawetz *et al.*, 2012).

2.2 Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri gram negatif yang menjadi anggota flora normal pada usus manusia. Bakteri ini memiliki bentuk batang dan pendek (*coccobacillus*) dengan ukuran 0,4 - 0,7 μm . *Escherichia coli* termasuk kedalam famili *Enterobacteriaceae* yang memiliki sifat mikroaerofilik (Warsa, 1994).



Gambar 2. *Escherichia coli* pembesaran x1000 (Brooks *et al.*, 2013).

Escherichia coli berkembang baik pada agar *MacConkey*. Koloni bakteri ini berbentuk sirkular, konveks, dan halus dengan tepi yang tegas. Bakteri ini melakukan fermentasi glukosa, sering disertai produksi gas, katalase positif, oksidase negatif, dan mereduksi nitrat menjadi nitrit. Bakteri *Escherichia coli* menunjukkan respon positif pada tes indol, lisin dekarboksilase, dan fermentasi manitol, serta menghasilkan gas dari glukosa (Brooks *et al.*, 2013).

Manifestasi klinik infeksi oleh *Escherichia coli* bergantung pada tempat infeksi dan tidak dapat dibedakan dengan gejala infeksi yang disebabkan oleh bakteri lain (Brooks *et al.*, 2013). Penyakit yang disebabkan oleh *Escherichia coli* yaitu :

1. Infeksi Saluran Kemih

Escherichia coli merupakan penyebab infeksi saluran kemih pada kira-kira 90 % wanita muda. Gejala dan tanda-tandanya antara lain sering kencing, disuria, hematuria, dan piuria. Nyeri pinggang berhubungan dengan infeksi saluran kemih bagian atas.

2. Diare

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

a. *E. coli* Enteropatogenik (EPEC)

EPEC penyebab penting diare pada bayi, khususnya di negara berkembang. EPEC sebelumnya dikaitkan dengan wabah diare pada anak-anak di negara maju. EPEC melekat pada sel mukosa usus halus.

b. *E. coli* Enterotoksigenik (ETEC)

ETEC penyebab yang sering dari “diare wisatawan” dan penyebab diare pada bayi di negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang

spesifik untuk manusia menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil.

c. *E. coli* Enterohemoragik (EHEK)

EHEK menghasilkan verotoksin, dinamai sesuai efek sitotoksiknya pada sel Vero, suatu ginjal dari monyet hijau Afrika. Paling sedikit ada dua bentuk antigenik toksik. EHEC menimbulkan kolitis hemoragik, diare yang beras, dan pada sindroma hemolitik uremik, suatu penyakit mengakibatkan gagal ginjal akut, anemia hemolitik, mikroangiopati, dan trombositopenia.

d. *E. coli* Enteroinvasif (EIEC)

EIEC menimbulkan penyakit yang sangat mirip dengan shigelosis. Penyakit yang paling sering pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju negara tersebut. Galur EIEC bersifat non-laktosa atau melakukan fermentasi laktosa dengan lambat serta bersifat tidak dapat bergerak. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus.

e. *E. coli* Enteroagregatif (EAEC)

EAEC menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di negara berkembang

3. Sepsis

Bila pertahanan pejamu yang normal tidak adekuat, *E. coli* dapat masuk peredaran darah dan menyebabkan sepsis (Brooks *et al.*, 2013).

4. Meningitis

E. coli dan *Streptococcus* grup B adalah penyebab utama meningitis pada bayi (Brooks *et al.*, 2013).

Escherichia coli tergolong ke dalam bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki selubung sel yang terdiri atas membran dalam, lapisan tunggal peptidoglikan, dan membran luar. Selubung sel yang hanya terdiri dari lapisan tunggal peptidoglikan tidak tahan terhadap alkohol, sehingga pada saat dilakukan pembilasan dengan alkohol (pada pewarnaan gram), warna yang lapisan peptidoglikan yang dicat dengan kristal violet akan luntur, dan hanya mempertahankan tinta safranin yang diberikan setelah pembilasan dengan alkohol. Hal ini memberikan warna merah muda pada bakteri gram negatif (Jawetz *et al.*, 2012).

Pada bakteri *Escherichia coli* dilakukan uji biokimiawi TSIA dan sitrat, untuk membedakan antara bakteri *Escherichia coli* dengan *Pseudomonas aeruginosa*. Sebab secara mikroskopis, bakteri ini mempunyai bentuk dan warna yang sama sehingga perlu dilakukan uji biokimiawi untuk membedakannya. TSIA (*triple sugar iron agar*) adalah agar yang berisi beberapa nutrisi. Pada bakteri *Escherichia coli*, bakteri ini akan memfermentasikan gula sehingga menghasilkan asam dan akan menghasilkan warna kuning. Berbeda dengan bakteri *Escherichia coli*, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akan menimbulkan asam jika diberi sitrat (Jawetz *et al.*, 2012).

2.3 Tanaman Salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.)

Salam adalah tanaman yang tumbuh liar di hutan dan pegunungan, atau biasa ditanam di perkarangan dan sekitar rumah. Pohon ini dapat ditemukan di daerah dataran rendah sampai ketinggian 1.400 m dpl. Tinggi pohon salam mencapai 25 m, batang bulat, permukaan licin, bertajuk rimbun dan berakar tunggang. Daun dari tanaman ini tunggal, letak berhadapan, dengan panjang tangkai daun 0,5-1 cm. Helai daun berbentuk lonjong sampai elips atau bundar telur sungsang, ujung meruncing, pangkal runcing, tepi rata, pertulangan menyirip, permukaan atas licin berwarna hijau tua, permukaan bawah berwarna hijau muda, panjang 5-15 cm, lebar 3-8 cm, dan jika diremas berbau harum. Bunga majemuk tersusun dalam malai yang keluar dari ujung ranting, berwarna putih, dan berbau harum. Buahnya buah buni, bulat, diameter 8-9 mm, buah muda berwarna hijau, setelah masak menjadi merah gelap, rasanya agak sepat. Biji bulat, diameter sekitar 1 cm, berwarna coklat (Dalimartha, 2000).



Gambar 3. *Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp. (Dalimartha, 2000)

2.3.1 Penamaan dan Klasifikasi Salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.)

Tanaman salam adalah tanaman yang berasal dari Indonesia dan memiliki nama berbeda di setiap daerah. Di pulau Sumatera, salam disebut meselangan atau ubar serai. Sedangkan di pulau Jawa disebut gawok, manting, dan salam. Nama ilmiah daun salam adalah *Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp. dengan nama lain yaitu *Eugenia polyantha* Wight. dan *Eugenia lucidula* Miq. (Dalimartha, 2000). Klasifikasi salam adalah sebagai berikut (Sumono & Sd, 2008).

Kingdom	: <i>Plantae</i> (Tumbuhan)
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Divisi	: <i>Spermstrophyta</i>
Subdivisi	: <i>Pinophyta</i>
Kelas	: <i>Coniferopsida</i>
Famili	: <i>Eugenia</i>
Genus	: <i>Myricales</i>
Spesies	: <i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.] Walp.

2.3.2 Kandungan dan Manfaat Daun Salam *Syzygium polyanthum*

[Wight.] Walp.

Sebagian besar masyarakat di Indonesia menggunakan daun salam sebagai pelengkap bumbu dapur karena bau harum yang dimiliki daun salam dan dapat menyedapkan rasa masakan. Akan tetapi, daun salam tidak hanya bermanfaat sebagai pelengkap bumbu dapur saja. Secara

empiris daun salam dapat digunakan dalam terapi. Sebagai contoh, daun salam dapat digunakan untuk mengurangi hipertensi, diabetes, diare, gastritis, mabuk, dan penyakit kulit. Tumbuhan ini juga mempunyai efek diuretik dan analgesik (Sumono & Sd, 2008). Manfaat-manfaat daun salam tersebut dihasilkan oleh kandungan senyawa kimia yang dimilikinya. Senyawa kimia yang terkandung dalam daun salam adalah flavonoid, tannin, minyak atsiri, triterpenoid, alkaloid, dan steroid. Flavonoid, tannin, minyak atsiri, dan alkaloid memiliki efek antibakteri sedangkan steroid triterpenoid dan steroid memiliki efek analgesik (Dalimartha 2000; Kusuma *et al.*, 2011).

Berdasarkan beberapa penelitian, senyawa yang terkandung dalam daun salam yang dapat menjadi antibakteri adalah sebagai berikut.

1. Flavonoid merupakan senyawa polar yang umumnya mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, menthanol, butanol, dan aseton. Flavonoid adalah golongan terbesar dari senyawa fenol. Senyawa fenol memiliki kemampuan antibakteri dengan cara mendenaturasi protein yang menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri (Cushnie & Lamb, 2011).
2. Tannin dapat mengganggu permeabilitas membran sel bakteri dan memiliki kemampuan mencegah koagulasi plasma pada *Staphylococcus aureus* (Akiyama *et al.*, 2001)
3. Minyak atsiri juga berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu enzim yang membantu pembentukan energi sehingga

memperlambat pertumbuhan sel. Minyak atsiri dalam jumlah banyak dapat juga mendenaturasi protein (Nazzaro *et al.*, 2013).

4. Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme alkaloid sebagai inhibitor pertumbuhan bakteri adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Kurniawan & Aryana, 2015).

2.4 Uji Sensitivitas Antibakteri (*Disc Diffusion Testing*)

Prinsip *disc diffusion test* telah digunakan di laboratorium mikrobiologi selama lebih dari 70 tahun. Alexander Fleming menggunakan varian dari teknik ini ketika bekerja dengan penisilin pada 1950-an. Pada saat itu, ada banyak prosedur berbeda yang digunakan. Bauer, Kirby, Sherris, dan Turck menguji semua variabel digunakan dalam prosedur, seperti media, suhu, dan kedalaman agar. Pada tahun 1966, mereka menerbitkan hasil dari penelitian mereka yang akhirnya menjadi panduan yang digunakan saat ini (Coyle, 2005). Tahap-tahap pengujian adalah sebagai berikut.

2.4.1 Pemilihan Koloni

Salah satu langkah yang paling penting dalam proses pengujian adalah mempersiapkan inokulum. Hal ini melibatkan pemilihan koloni yang tepat untuk pengujian, menanggukkan mereka dalam *broth*, dan standardisasi suspensi.

2.4.2 Persiapan Suspensi Bakteri

Ada dua metode untuk persiapan inokulum yaitu suspensi koloni langsung dan pertumbuhan fase log. Hanya metode suspensi koloni langsung yang akan memberikan hasil akurat untuk beberapa organisme. Untuk kedua metode, kekeruhan suspensi uji harus distandarisasi dengan standar 0,5 McFarland (sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Suspensi yang disesuaikan harus digunakan sebagai inokulum dalam waktu 15 menit.

Untuk metode suspensi koloni langsung, koloni tidak boleh lebih tua dari 18-24 jam. Standarisasi inokulum pada saat yang sama dengan mempersiapkan suspensi. Menangguhkan koloni dalam garam atau kaldu (misalnya *Mueller-Hinton* atau *tryptic* kedelai). Kemudian, kekeruhan inokulum disesuaikan setara dengan standar 0,5 McFarland. Kekeruhan suspensi dapat dibandingkan dengan menempatkan tabung di depan kertas putih atau kartu berkas dengan garis-garis hitam. Menggunakan suspensi koloni langsung untuk organisme seperti semua *Staphylococci* dan *Streptococcus*.

2.4.3 Persiapan Wadah Inokulum

Wadah *disc* dikeluarkan dari *freezer* atau kulkas. Sebelum membuka wadah, *disc* dibiarkan terpapar suhu ruangan selama satu sampai dua jam untuk meminimalkan kondensasi dan mengurangi kemungkinan kelembaban yang mempengaruhi konsentrasi agen antimikroba. Wadah

Mueller-Hinton Agar (MHA) dibiarkan untuk sehangat suhu kamar sehingga kelembaban berlebih akan diserap ke dalam media. Langkah ini dapat dipercepat dengan menempatkan wadah di inkubator dengan tutup terbuka selama 10-15 menit. Wadah MHA harus memiliki kedalaman yang tepat kurang lebih dari 4mm. Suspensi organisme di-*vortex* untuk memastikan tercampur. Kemudian, kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi. Kelebihan cairan dari *swab* dibuang dengan menekan melawan sisi tabung.

2.4.4 Inokulasi Wadah

Inokulasi dimulai pada bagian atas permukaan wadah MHA dengan swab. Wadah diusahakan tertutup rata dengan mengusap bolak-balik dari ujung ke ujung. Wadah diputar sekitar 60° dan ulangi prosedur *swabbing*. Wadah diputar 60° lagi dan usap seluruh piring ketiga kalinya. Hal ini akan memastikan bahwa inokulum yang merata didistribusikan.

2.4.5 Penempatan *Antimicrobial Disc*

Antimicrobial disc ditempatkan dalam 15 menit setelah menginokulasi MHA *plate*. *Disc* dapat ditaruh satu persatu atau secara bersama-sama dengan alat *multichannel disc dispenser*. *Disc* ditaruh pada setiap bagian MHA yang telah dibagi. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

2.4.6 Pengukuran Zona Hambat

Zona hambat diperiksa dengan teliti tidak ada koloni. Wadah dipegang beberapa inchi dari alas gelap. Diameter zona hambat diukur dengan penggaris atau kaliper.

Tabel 1. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri (Coyle, 2005)

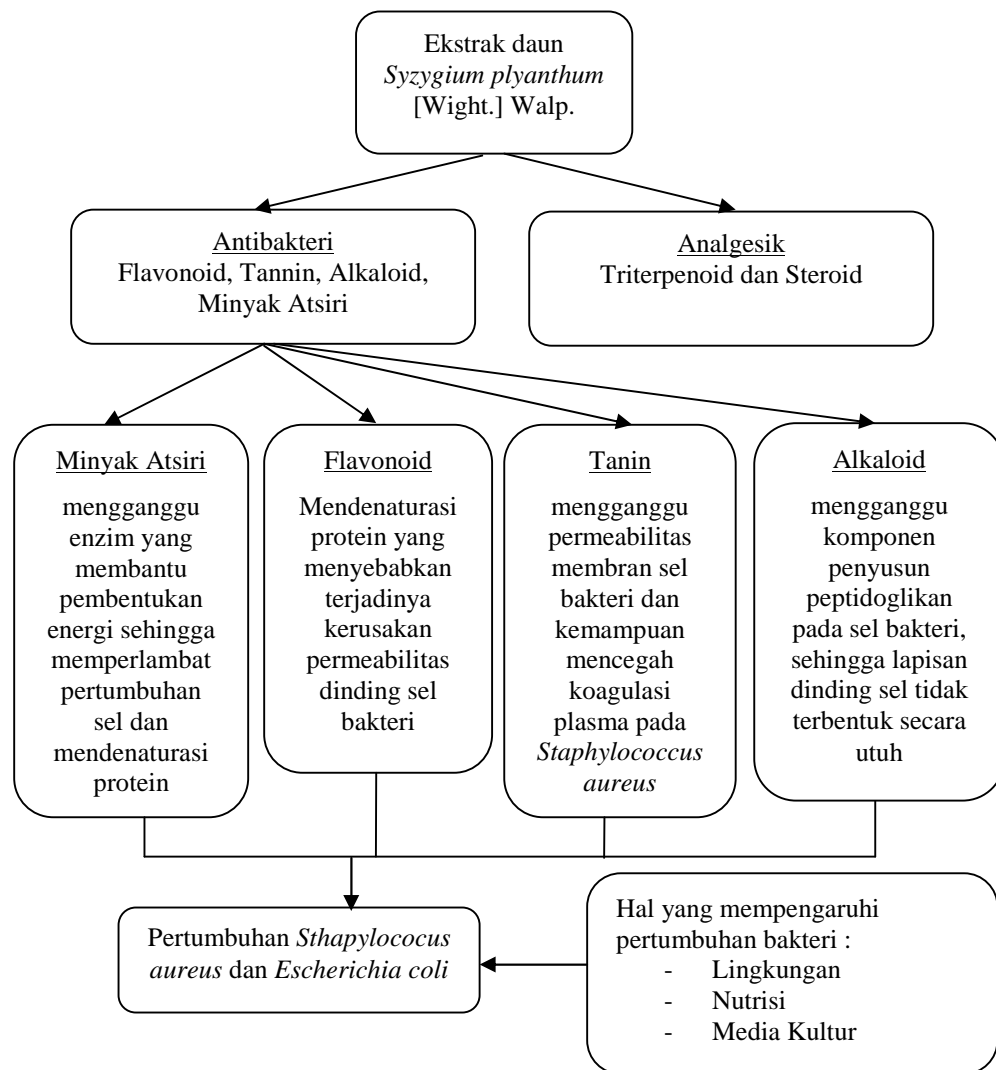
Diameter zona terang	Respon hambatan pertumbuhan
> 20 mm	Kuat
16-20 mm	Sedang
10-15 mm	Lemah
< 10 mm	Tidak ada

2.5 Kerangka Teori

Daun salam (*Syzygium plyphanthum* [Wight.] Walp) memiliki beberapa manfaat seperti antikolesterol, antihipertensi, antiglikemik, dan antibiotik (Lajuck, 2012; Widyawati *et al.*, 2015). Manfaat daun salam tersebut berasal dari senyawa-senyawa yang terkandung didalamnya yaitu flavonoid, tannin, minyak atsiri, triterpenoid, alkaloid, dan steroid (Dalimartha 2000; Kusuma *et al.*, 2011). Diantara senyawa-senyawa tersebut, senyawa-senyawa yang dapat berfungsi sebagai antibiotik adalah flavonoid, tannin, minyak atsiri, triterpenoid, alkaloid, dan steroid. Flavonoid, tannin, minyak atsiri, dan alkaloid memiliki efek antibakteri sedangkan steroid triterpenoid dan steroid memiliki efek analgesik (Dalimartha 2000; Kusuma *et al.*, 2011).

Senyawa-senyawa antibiotik pada daun salam memiliki mekanisme yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Flavonoid dapat mendenaturasi protein yang menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri (Cushnie & Lamb, 2011). Tannin dapat mengganggu permeabilitas membran sel bakteri dan memiliki kemampuan mencegah koagulasi plasma pada *Staphylococcus aureus* (Akiyama *et al.*, 2001). Minyak atsiri mengganggu enzim yang membantu pembentukan energi sehingga memperlambat pertumbuhan sel. Minyak atsiri dapat mengganggu enzim yang membantu pembentukan energi sehingga memperlambat pertumbuhan sel dan dalam jumlah banyak dapat juga mendenaturasi protein (Nazzaro *et al.*, 2013). Alkaloid mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Kurniawan & Aryana, 2015).

Pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh beberapa hal seperti lingkungan hidup, nutrisi, dan media kultur. Lingkungan yang cocok untuk pertumbuhan bakteri adalah lingkungan yang memiliki suhu, zat makanan, temperatur, aerasi (kadar oksigen) yang cocok bagi bakteri untuk tumbuh. Kadar nutrisi cukup penting untuk bakteri tumbuh seperti kadar nitrogen, oksigen, dan lain-lain. Media biakan adalah media tempat bakteri di kultur yaitu pada bakteri gram negatif menggunakan agar *MacConkey* dan bakteri gram positif menggunakan lempeng agar darah (Jawetz *et al.*, 2012).



Gambar 4. Kerangka Teori Penelitian

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 5. Kerangka Konsep Penelitian

2.7 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah terdapat perbedaan daya hambat ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp) pada masing-masing konsentrasi terhadap pertumbuhan infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimen laboratorium dengan desain penelitian eksperimen perbandingan kelompok statis (*static group comparison*) (Notoadmojo, 2012). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *kirby bauer disc diffusion*, yaitu menggunakan kertas *disc* yang mengandung ekstrak daun salam *Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp. yang kemudian diletakan ke dalam media kultur.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium FMIPA Kimia, UPTD *Balai* Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai dengan bulan Desember 2015.

3.3 Bahan Uji dan Bakteri Uji

3.3.1 Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam *Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp. yang berwarna hijau tua dan dipetik dari Kebun Fakultas Pertanian Universitas Lampung, Provinsi Lampung pada bulan Oktober 2015. Daun salam yang telah dipetik akan dibersihkan, dikeringkan, dan dibawa ke Laboratorium FMIPA Kimia Universitas Lampung untuk diekstrak.



Gambar 6. Daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.)

3.3.2 Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri gram positif (+) yaitu *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif (-) yaitu *Escherichia coli*. Baik bakteri gram positif maupun negatif

didapatkan dari UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.

3.3.3 Media Kultur

Media kultur yang digunakan pada penelitian ini adalah *nutrient agar* (media awal), media lempeng agar darah yang digunakan untuk mengkultur bakteri *Staphylococcus aureus* dan media agar *MacConkey* yang digunakan untuk mengkultur bakteri *Escherichia coli*. Kemudian digunakan media agar MHA (*Muller Hinton Agar*) sebagai media tempat dilakukannya uji daya hambat bakteri.

3.4 Identifikasi Variabel

Variabel dalam penelitian ini dibagi ke dalam beberapa bagian, yaitu variabel independen dan dependen.

3.4.1 Variabel Dependen

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) dalam berbagai tingkat konsentrasi.

3.4.2 Variabel Independen

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang dipengaruhi oleh

variabel dependen atau ekstrak daun salam dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

3.5 Definisi Operasional

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian dan agar penelitian tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional sebagai berikut.

Tabel 2. Definisi operasional variabel dependen dan independen penelitian

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil Ukur	Skala	
Variabel Dependen						
1	Ekstrak daun salam (<i>Syzygium polyanthum</i> [Wight.] Walp.)	Ekstrak daun salam yang diperoleh dengan metode maserasi	Mikropi pet	Menggunakan persamaan; $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ Keterangan $N_1 =$ Konsentrasi awal $V_1 =$ Volume awal $N_2 =$ Konsentrasi akhir $V_2 =$ Volume akhir	$N_2= 100\%$ $V_1=50 \text{ mL}$ $N_2=80\%$ $V_1=40\text{mL}$ $N_2=60\%$ $V_1=30 \text{ mL}$ $N_2=40\%$ $V_1=20\text{mL}$ $N_2=20\%$ $V_1=10\text{mL}$	Rasio
Variabel Independen						
2	Perbandingan zona hambat (mm) Pada pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Escherichia coli</i> .	Pertumbuhan mikroba yang terbentuk setelah diberikan variabel dependen dan kontrol dengan kertas <i>disc</i> .	Jangka sorong	Dengan menggunakan metode kirby <i>bauer</i>	Zona hambat (mm)	Rasio

3.6 Besar Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun salam dalam berbagai konsentrasi (20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%) serta kontrol positif dan negatif untuk yang akan diberikan untuk pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Rumus yang digunakan untuk menentukan besar sampel adalah rumus federer (Sastroasmoro & Sofyan, 2014).

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

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$n \geq 3,5$$

Keterangan :

n = banyaknya sampel (pengulangan)

k = banyaknya perlakuan

Berdasarkan hasil diatas maka besar sampel yang digunakan adalah 3,5.

Untuk menghindari terjadinya kesalahan, maka dibulatkan ke atas menjadi 4.

Besar sampel ini digunakan sebagai acuan dilakukan pengulangan dalam penelitian ini.

3.7 Prosedur Penelitian

Dalam penelitian ini, ekstrak daun salam diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi di dalam tabung reaksi. Lalu setelah terbentuk

konsentrasi yang diinginkan, ke dalamnya diberikan kertas *disc*. Kertas *disc* ini yang nantinya akan digunakan ke dalam media agar untuk melihat daya hambat ataupun bunuh minimal dari pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian ini akan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali.

3.7.1 Persiapan

3.7.1.1 Alat Penelitian

1. Rak dan tabung reaksi
2. Ose
3. *Beaker glass*
4. Pipet tetes dan pipet mikro
5. Kapas alkohol
6. Cawan petri
7. Alat pengaduk dan nephelometer
8. *Autoclave*
9. Inkubator

3.7.1.2 Bahan Penelitian

1. Ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) yang diperoleh dari ekstraksi daun salam. Proses pengekstrakan dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.

2. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.
Bakteri diperoleh dari UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Lampung.
3. Media agar berupa *nutrient agar*, lempeng agar darah, *MacConkey*, dan MHA (*Muller Hinton Agar*).
4. Aquades steril

3.7.2 Sterilisasi Alat

Alat dan bahan penelitian disterilisasi, kecuali ekstrak daun salam dan suspensi kuman, agar terhindar dari senyawa atau mikroorganisme lain yang mungkin dapat mempengaruhi hasil penelitian, dengan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Alat-alat yang digunakan ditunggu sehingga mencapai suhu kamar dan kering

3.7.3 Pembuatan Ekstrak Daun Salam

Daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) dibersihkan dan dibawa ke Laboratorium FMIPA Unila. Daun salam kemudian dikeringkan menggunakan alat pengering dengan suhu 40° selama 48 jam. Daun salam yang telah kering dihaluskan menjadi serbuk dengan alat *disk mill* yaitu alat untuk membuat tepung. Daun salam yang telah halus kemudian dimaserasi yaitu daun salam dimasukkan ke dalam wadah tertutup, lalu dituang ethanol 96% ke dalam wadah tertutup tersebut, setelah itu dikocok, kemudian didiamkan selama 2-3 hari, setelah itu disaring ke dalam erlenmeyer vakum menggunakan corong

buchner dan pompa vakum. Setelahnya disaring menggunakan kertas saringan. Selanjutnya larutan hasil penyaringan tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak daun salam pekat yang terbentuk (kadar konsentrasi 100%) akan diencerkan dengan menggunakan akuades steril dengan tingkat konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20% menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan:

N_1 = Konsentrasi 100% (%)

V_1 = Volume larutan dengan konsentrasi 100% yang diperlukan (ml)

N_2 = Konsentrasi yang diinginkan (%)

V_2 = Volume konsentrasi yang diinginkan (ml)

3.7.4 Identifikasi Uji Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan dengan pewarnaan dan tes biokimiawi, diantaranya adalah sebagai berikut.

1. Pewarnaan Gram

Dari bakteri uji yang diterima dibuat sediaan diatas *object glass*, lalu diwarnai dengan prinsip pewarnaan gram, dan diamati di bawah mikroskop.

2. Kultur Bakteri

Kultur bakteri pada masing-masing media hidup yang sesuai. Media agar darah untuk bakteri gram positif dan *MacConkey* untuk bakteri gram negatif

3. Tes Biokimiawi Bakteri Gram Positif

a. Tes Katalase

Untuk membedakan *Staphylococcus sp* dengan *Streptococcus sp* dilakukan dengan cara meneteskan H_2O_2 pada koloni yang diambil sebanyak satu ose dan dipindahkan ke atas kaca objek. Hasil positif apabila terdapat busa, menandakan *Staphylococcus sp*. Hasil negatif apabila tidak terdapat busa yang menandakan *Streptococcus sp*.

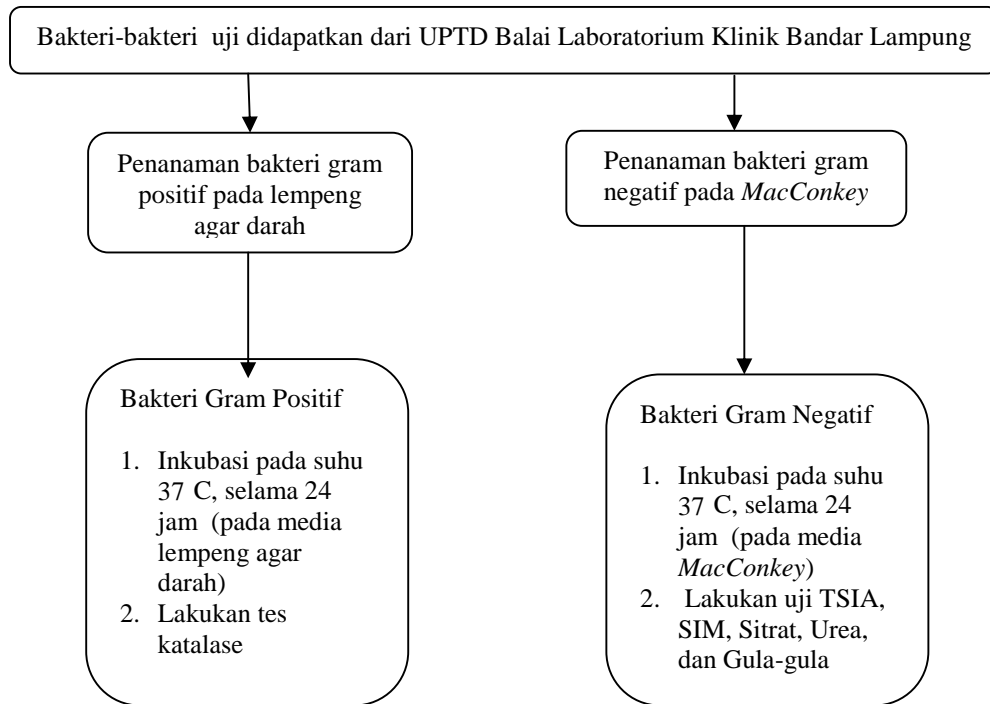
4. Tes Biokimiawi Bakteri Gram Negatif

a. Uji TSIA

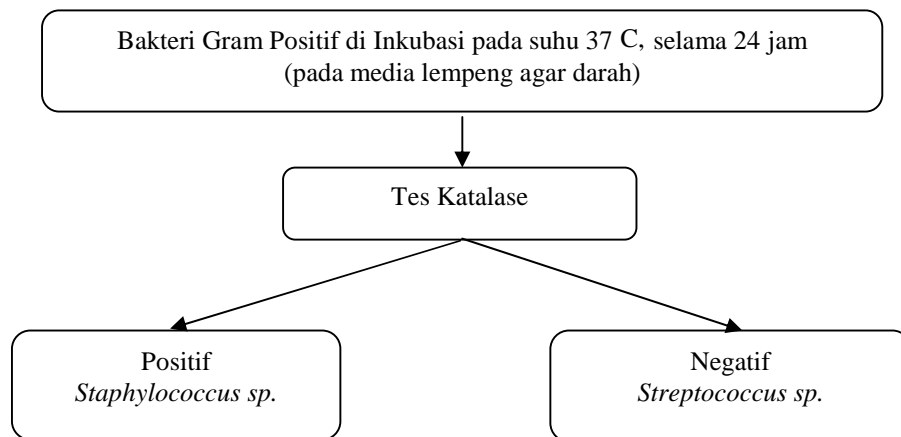
Berupa agar miring yang mengandung 3 jenis gula yaitu glukosa, laktosa, dan sakarosa. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri memfermentasi gula dan menghasilkan sulfur.

b. Uji Sitrat

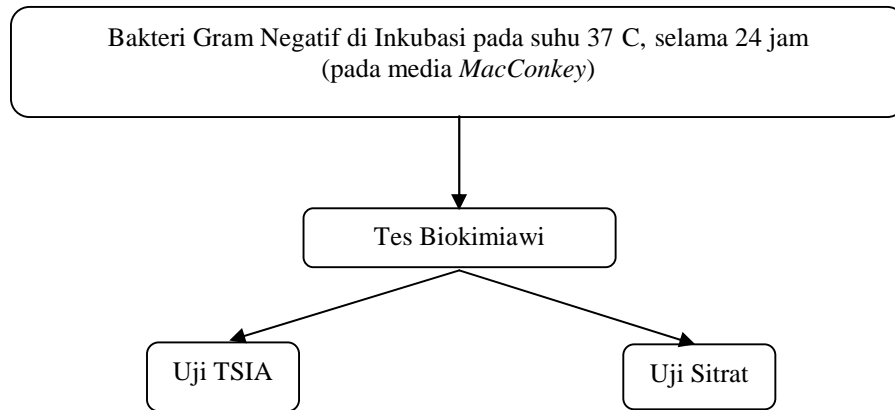
Merupakan tes biokimiawi untuk melihat kemampuan suatu organisme untuk menggunakan natrium sitrat sebagai sumber utama metabolisme dan pertumbuhan. Positif bila berubah warna menjadi warna biru yang bermakna timbul warna asam.



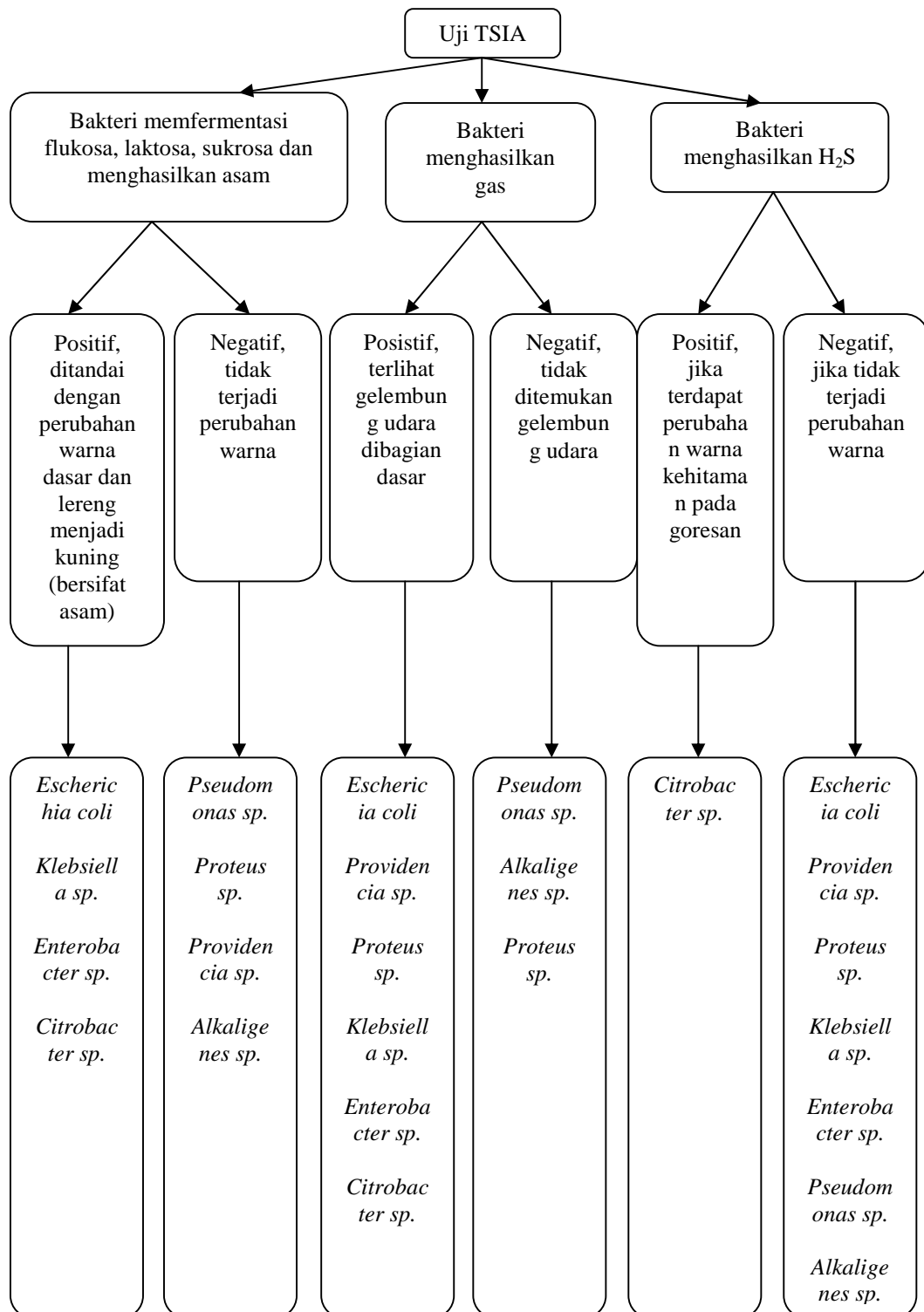
Gambar 7. Diagram alur penelitian identifikasi bakteri



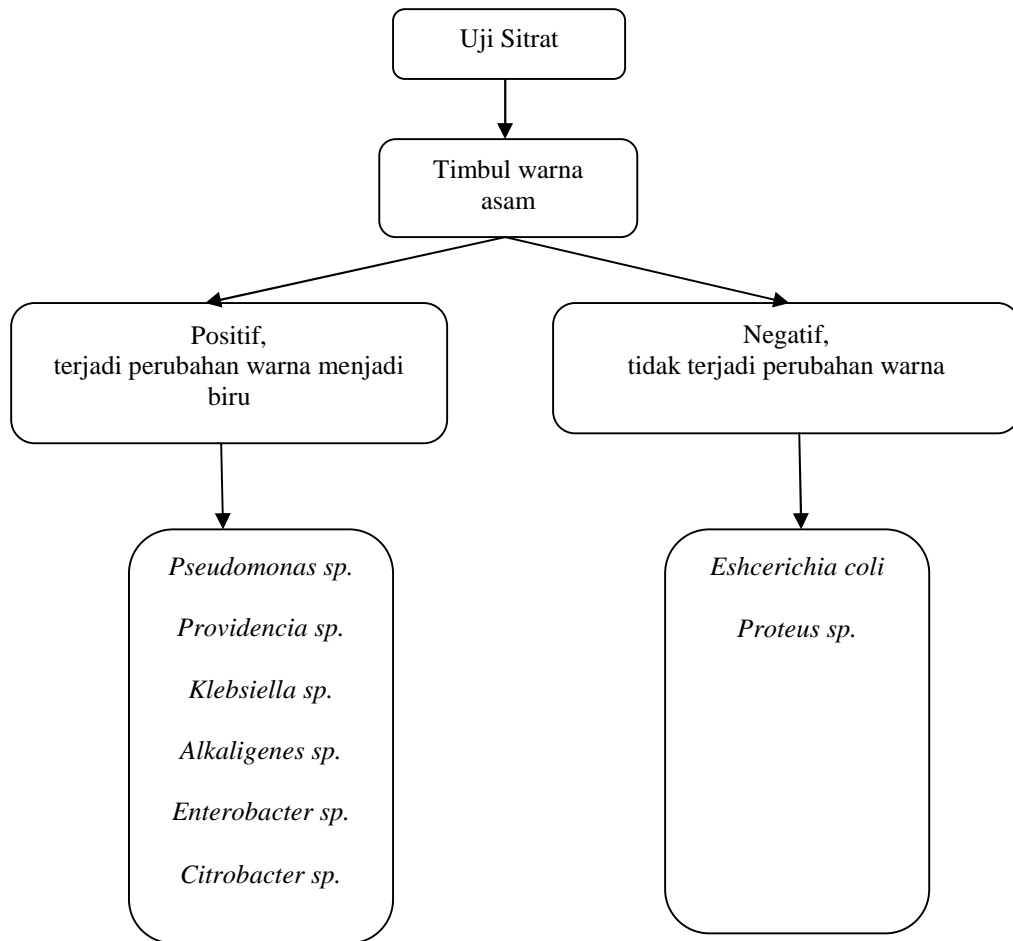
Gambar 8. Diagram alur penelitian identifikasi bakteri gram positif



Gambar 9. Diagram alur penelitian identifikasi bakteri gram negatif



Gambar 10. Diagram alur tes biokimawi gram negatif dengan uji TSIA



Gambar 11. Diagram alur tes biokimiawi bakteri gram negatif dengan uji sitrat

3.7.5 Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan *McFarland*

Larutan baku *McFarland* terdiri atas 2 komponen, yaitu larutan BaCl_2 1% dan H_2SO_4 1%. Larutan BaCl_2 1% sebanyak 0,05 ml dicampur dengan larutan H_2SO_4 1% sebanyak 9,95 ml dan dikocok homogen. Nilai absorban larutan baku *McFarland* 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Larutan harus dikocok terlebih dahulu hingga homogen setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi bakteri.

3.7.6 Teknik Pembuatan Suspensi Bakteri

1. Bakteri strain murni *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dibuat suspensi dengan menambahkan larutan NaCl 0,9% di dalam tabung yang berbeda, sampai didapatkan kekeruhan yang disesuaikan dengan standar kekeruhan *McFarland* 0,5 untuk mendapatkan bakteri sebanyak 10^8 cfu/mL.
2. Cara untuk menentukan kekeruhannya adalah dengan menggunakan alat nephelometer. Kekeruhan dilihat dengan mengambil sedikit suspensi ke dalam tabung reaksi yang lebih kecil dan memasukkannya ke lubang pada nephelometer dan dilihat angka kekeruhannya. Jika kurang keruh, suspensi ditambahkan koloni sedangkan jika lebih keruh ditambahkan NaCl 0,9%.

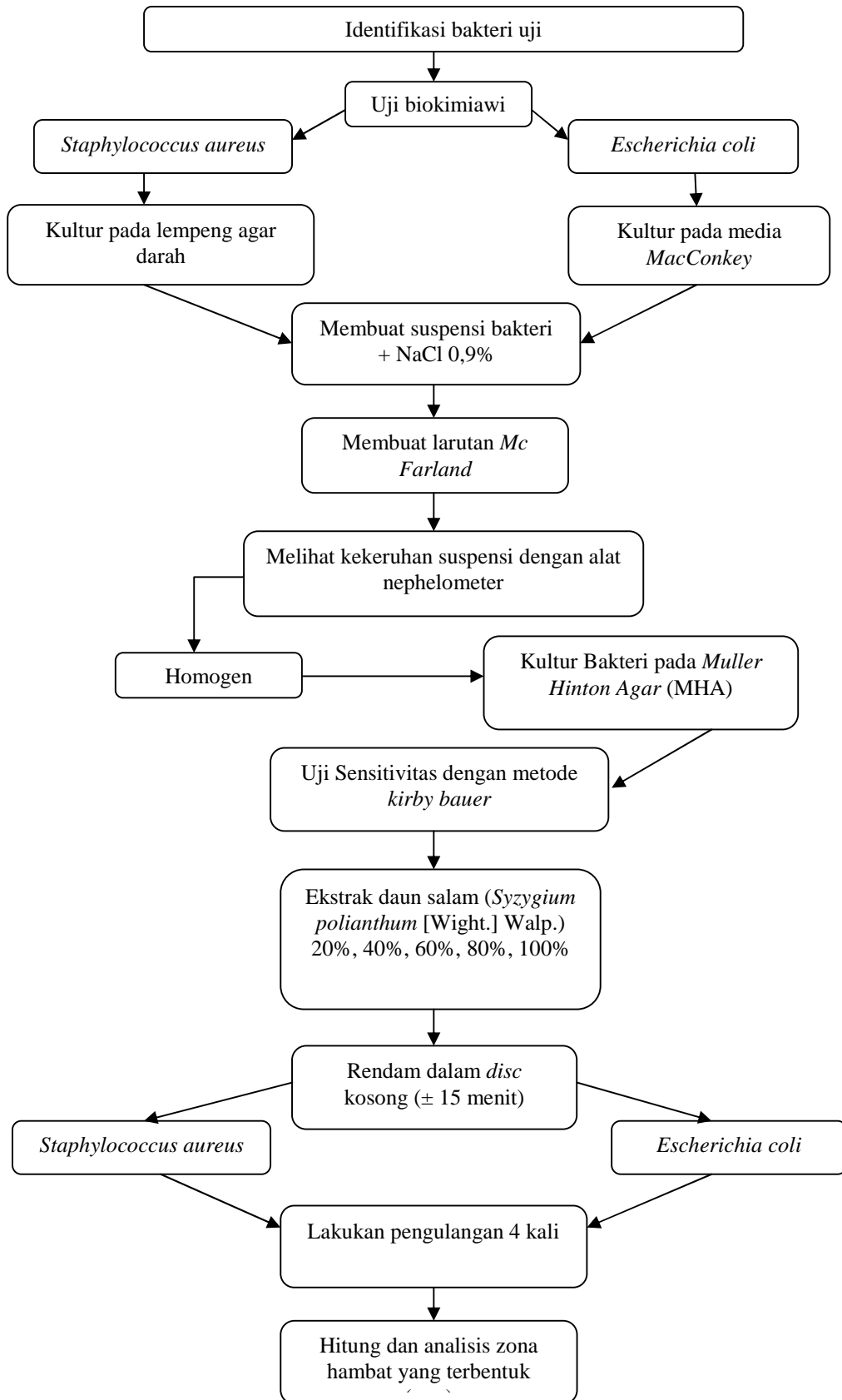
3.7.7 Teknik Pembuatan Media Agar MHA (*Muller Hinton Agar*)

Timbang 9,5 gram *Muller Hinton Agar*/ MHA (38 gr/L) dengan komposisi medium (*Beef infusion* 300 gram, *Casamino acid* 17,5 gram, *Starch* 1,5 gram, dan agar) dilarutkan dalam 250 mL akuades lalu dipanaskan hingga mendidih kemudian disterilkan dalam *autoklaf* selama 20 menit dengan tekanan udara 1 atm suhu 121 C.

3.7.8 Uji Daya Hambat *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Kirby Bauer

1. Pada lempeng *Muller Hinton Agar* (MHA), diusapkan biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan lidi kapas steril (media I).
2. Pada lempeng *Muller Hinton Agar* (MHA), diusapkan biakan bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan lidi kapas steril (media II).
3. Diletakan cakram kertas yang telah direndam selama ± 15 menit dengan ekstrak temulawak dengan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40% dan 20% pada media I dan II dengan jarak ± 15 mm.
4. Sebagai kontrol positif, digunakan kertas cakram yang direndam dalam antibiotik (gram positif dan negatif) selama ± 15 menit.
5. Sebagai kontrol negatif, digunakan kertas cakram yang direndam dalam akuades steril selama ± 15 menit.
6. Kedua media (media I dan II) diinkubasi pada suhu 37 C selama 24 jam.

7. Diukur zona hambat yang terbentuk disekitar cakram dengan menggunakan penggaris.
8. Prosedur dilakukan pengulangan sebanyak empat kali.



Gambar 12. Diagram alur kerja penelitian

3.8 Pengolahan dan Analisis Data

3.8.1 Pengolahan Data

Data yang diperoleh secara deskriptif melalui pencatatan hasil identifikasi kultur bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Escherichia coli* setelah diberikan perlakuan terhadap ekstrak daun salam pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, kontrol negatif (akuades), dan juga kontrol positif (antibiotik). Data disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar. Data diolah dengan software pengolahan data.

3.8.2 Analisis Data

Besar sampel dalam penelitian ini > 50 , oleh karena itu digunakan uji *Kolmogorov Smirnov*. Distribusi dikatakan normal bila $p > 0,05$ (memenuhi asumsi normalitas) dan jika $p < 0,05$ distribusi dikatakan tidak normal. Apabila data berdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji *Independent t test*. Jika data berdistribusi normal maka uji statistik yang akan digunakan adalah *Mann-Whitney*.

Analisis ini digunakan untuk menganalisis dua variabel yaitu variabel independen dan dependen yaitu untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perbandingan pemberian ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus*

aureus dan *Escherichia coli*. Interpretasi uji statistik yang dilakukan adalah sebagai berikut.

1. Bila $p \text{ value} < (0,05)$ maka hasil bermakna/signifikan, artinya ada hubungan bermakna antara variabel independen dan dependen, atau H_0 ditolak.
2. Bila $p \text{ value} > (0,05)$ H_0 diterima, hal ini berarti bahwa data sampel tidak mendukung adanya perbedaan yang bermakna. Bila $p \text{ value} > \quad$, maka perlu dilakukan analisis *post-hoc*, untuk melihat perbedaan antar kelompok.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Sedangkan pada pertumbuhan *Escherichia coli*, ekstrak etanol daun salam tidak menimbulkan daya hambat secara *in vitro*.
2. Terdapat perbedaan pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*.

5.2 Saran

5.2.1 Peneliti Lain

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, peneliti memiliki beberapa saran untuk penelitian-penelitian selanjutnya guna melengkapi penelitian ini, yaitu :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektifitas ekstrak daun salam terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan menentukan kadar dibawah 20%.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai khasiat farmakologis zat-zat aktif yang terkandung di dalam daun salam terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif lain.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efektifitas ekstrak daun salam terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan menggunakan metode yang berbeda dengan penelitian ini.

5.2.2 Masyarakat

Hendaknya dapat digunakan dalam digunakan masyarakat dalam pengobatan menggunakan daun salam (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.).

DAFTAR PUSTAKA

- Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki, K., 2001. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(4), 487-491.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia., 2005. Standardisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Republik Indonesia, Salah Satu Tahapan Penting Dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia. *Info POM*, 6(4), 1-12.
- Brooks, G.F., Morse, S.A., Butel, J.S., Carroll, K.C., Mietzner, T.A., 2013. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 25*. Jakarta: EGC.
- Coyle, M.B., 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*, America: American Society for Microbiology.
- Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99-107.
- Dalimartha, S., 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Edisi 2*. Jakarta: Trubus Agiwidya.
- Hill, L.R., 1981. Taxonomy of the Staphylococci. *The Staphylococci: proceedings of the Alexander Ogston Centennial Conference*, 33-62.
- Jawetz, Melnick, Adelberg., 2012. *Jawetz, Melnick, And Adelberg 's medical Microbiology Edisi 25*. A. Adityaputri *et al.*, eds., Jakarta.
- Kurniawan, B., Aryana, W.F., 2015. Binahong (*Cassia alata* L) as Inhibitor of *Escherichia coli* Growth. *Majority*, 4(4), 100-104.
- Kusuma, I.W., Kuspradini, H., Arung, E.T., Aryani, F., Min, Y.H., Kim, J.S., Kim, Y.U., 2011. Biological Activity and Phytochemical Analysis of Three Indonesian Medicinal Plants, *Murraya koenigii*, *Syzygium polyanthum* and *Zingiber purpurea*. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 4(1), 75-79.

- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2011. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2406/Menkes/Per/XII/2011 tentang Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik.
- Lajuck, P., 2012. “Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) Lebih Efektif Kolesterol Total dan LDL Dibandingkan Statin pada Penderita Dislipidemia”. Tesis. Denpasar: Program Studi Ilmu Biomedik, Universitas Udayana.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P., 2012. *Brock Biology of Microorganisms* Edisi 13. San Francisco: Benjamin Cummings.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474.
- Notoadmojo, S., 2012. *Metodologi Penelitian Kesehatan*, Jakarta: Rineka Cipta.
- O'Neil, M.J. (Ed.), 2006. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* 14th ed. New Jersey: Merck
- Pangestu, A.L., 2013. “Aktivitas Antibakteri Fraksi Polar Ekstrak Etanol Daging Buah Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, dan *Staphylococcus aureus*, Beserta Bioautografinya”. Naskah Publikasi. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah.
- Sari, C.D.F., 2012. “Uji Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walp.) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Dan *Escherichia coli* ATCC 11229 Secara *In Vitro*”. Skripsi. Surakarta: Program Studi Pendidikan Dokter, Universitas Muhammadiyah.
- Sastroasmoro, S., Sofyan, I., 2014. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis* Edisi 5. Jakarta: Sagung Seto.
- Setiawan, V., 2014. “Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) Terhadap *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* Secara *In Vitro*”. Skripsi. Bandung: Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha.
- Sumono, A., SD, A.W., 2008. The use of bay leaf (*Eugenia polyantha* Wight) in dentistry. *Dental Journal*, 41(3), 147–150.
- Warsa, U.C., 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara.

Widyawati, T., Purnawan, W.W., Atangwho, I.J., Yusoff, N.A., Ahmad, M., Asmawi, M.Z., 2015. Anti-Diabetic Activity of *Syzygium polyanthum* (Wight) Leaf Extract, The Most Commonly Used Herb Among Diabetic Patients in Medan, North Sumatra, Indonesia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(4), 1698–1704.