

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK ETANOL TEH HIJAU TERHADAP
Escherichia coli SECARA IN VITRO**

(Skripsi)

**Oleh
POPI ZENIUSA**



**PROGRAM STUDI PENDIDIKANDOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK ETANOL TEH HIJAU TERHADAP
Escherichia coli SECARA IN VITRO**

Oleh

POPI ZENIUSA

Skripsi

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

Pada

**Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung**



**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2018**

ABSTRACT

THE INHIBITORY POWER OF GREEN TEA ETHANOL EXTRACT ON *Escherichia coli* IN VITRO

By

Popi Zeniusa

Background. Infection is one of the major causes of health problems in the world especially for *Escherichia coli* infections. Green tea is known to have antibacterial properties. This research is aimed to know the inhibitory power of green tea ethanol extract on growth of *Escherichia coli* bacteria.

Methods. This research was an experimental laboratoric with kirby bauer disc diffusion method. The sample of this study was *Escherichia coli*. Green tea ethanol extract concentration were: 20%, 40%, 60%, 80% and 100% . Inhibition obtained by measuring inhibition zone formed around the disc paper using a ruler. Statistical analyzes were performed using the Kruskal-Wallis test.

Results. This research was shown that there was a difference of inhibition zone diameter obtained use *Kruskal-Wallis* test that is $p < 0,05$ at all of group.

Conclusion. Green tea ethanol extract could inhibit the growth of *Escherichia coli* bacteria.

Keyword: *Escherichia coli*, green tea, inhibition zone diameter

ABSTRAK

UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK ETANOL TEH HIJAU TERHADAP *Escherichia coli* SECARA *IN VITRO*

Oleh

Popi Zeniusa

Latar Belakang. Infeksi merupakan salah satu penyebab utama masalah kesehatan di dunia khususnya untuk infeksi *Escherichia coli*. Teh hijau diketahui memiliki khasiat sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan mengetahui daya hambat ekstrak etanol teh hijau terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Metode Penelitian. Jenis penelitian ini adalah eksperimen laboratorium dengan metode difusi cakram kirby bauer. Sampel penelitian ini adalah *Escherichia coli*. Kadar ekstrak etanol teh hijau yaitu: 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Daya hambat diperoleh berdasarkan pengukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan penggaris. Analisis statistik yang dilakukan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

Hasil Penelitian. Penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan diameter zona hambat didapatkan dengan uji *Kruskal-Wallis*, yaitu $p < 0,05$ pada semua kelompok perlakuan.

Simpulan Penelitian. Ekstrak etanol teh hijau dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Kata kunci: diameter zona hambat, *Escherichia coli*, teh hijau

Judul Penelitian : **UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK ETANOL
TEH HIJAU TERHADAP *Escherichia coli*
SECARA *IN VITRO***

Nama Mahasiswa : Popi Zeniusa

Nomor Pokok Mahasiswa : 1418011164

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran



dr. M. Ricky Ramadhian, S. Ked., M. Sc
NIP 19830615 200812 1 001

dr. Syahrul Hamidi Nasution, S. Ked
NIP

MENGETAHUI

Dekan Fakultas Kedokteran

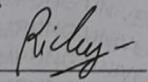
Dr. dr. Muhartono, S.Ked., M. Kes., Sp. PA
NIP 19701208 200112 1 001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua

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



Sekretaris

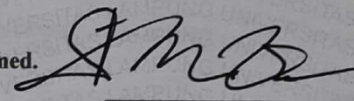
: dr. Syahrul Hamidi Nasution, S. Ked.



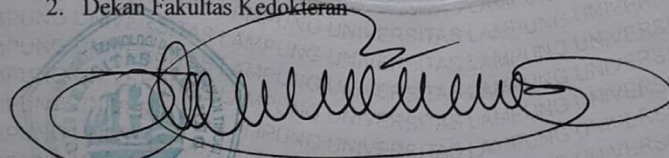
Penguji

Bukan Pembimbing

: Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed.



2. Dekan Fakultas Kedokteran



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 19 Desember 2017

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya, bahwa:

1. Skripsi dengan judul "**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK ETANOL TEH HIJAU TERHADAP *Escherichia coli* SECARA *IN VITRO***" adalah benar hasil karya saya, dan tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas hasil 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 jika dikemudian hari ada hal yang melanggar dari ketentuan akademik universitas, maka saya bersedia bertanggungjawab dan diberikan sanksi sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Bandar Lampung, Januari 2018

Penulis



Popi Zeniusa

RIWAYAT HIDUP

Penulis lahir di Kotaagung pada tanggal 08 September 1995, sebagai anak kedua dari tiga bersaudara, dari pasangan Bapak Mulyono dan Ibu Aminah. Penulis memiliki 1 orang kakak bernama Eka Erviana Sari, S.ST dan 1 orang adik yaitu Febi Zihan Vitara.

Pendidikan Taman Kanak-kanak (TK) diselesaikan di TK Dharma Wanita Kotaagung pada tahun 2002, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Negeri 1 Kuripan, Kotaagung pada tahun 2008, Sekolah Menengah Pertama (SMP) diselesaikan di SMP Negeri 1 Kotaagung pada tahun 2011, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) diselesaikan di SMA Negeri 1 Kotaagung pada tahun 2014. Pada saat SMA penulis sering mengikuti perlombaan baik di tingkat kabupaten maupun provinsi.

Pada tahun 2014, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah menjadi anggota di berbagai organisasi, diantaranya FSI Ibnu Sina, Gen-C dan Lunar.

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan ada kemudahan”
(QS. Al-Insyirah 94:5)

“Maka nikmat Tuhanmu yang manakah yang kamu dustakan?”
(QS. Ar-Rahman 55:13)

“Ancaman terbesar bagi keberhasilan hidup kita bukan berasal dari menggantungkan cita-cita setinggi langit hingga tak mampu mencapainya secara penuh, namun berasal dari pematokan cita-cita terlalu datar hingga mudah mencapainya.” (Michelangelo)

“Jika saya bisa memikirkan dan hati saya bisa meyakini, saya tahu saya mampu menggapainya.” (Jesse Jackson)

“Ilmu itu bukan yang dihapal, tetapi yang memberi manfaat.”
(Imam Syafi’i)

*Skripsi ini kupersembahkan untuk Ayah, Emak,
Kakak, Abang Ipar, Adik, Keponakanku tercinta,
Keluarga Besar dan seluruh orang yang paling
kusayangi*

*Terimakasih atas segala doa dan dukungan yang
tiada henti selama ini...*

SANWACANA

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT, 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 skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Skripsi berjudul "UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK ETANOL TEH HIJAU TERHADAP *Escherichia coli* SECARA *IN VITRO*" ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran di Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung.

Sebuah karya sederhana yang merupakan bagian dari perjalanan hidup penulis, karya yang penulis dedikasikan dan persembahkan untuk semua pihak yang telah berperan atas dorongan, bantuan, saran, kritik dan bimbingan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Dalam kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih 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. M. Ricky Ramadhian, S.Ked., M. Sc, selaku pembimbing pertama. Terimakasih atas semua bantuan, saran, bimbingan dan pengarahan ditengah kesibukan beliau, beliau tetap ada untuk membantu dalam penyusunan skripsi ini.
4. dr. Syahrul Hamidi Nasution, S.Ked., selaku pembimbing kedua. Terimakasih atas kesediaannya membimbing dan selalu memberikan semangat , saran, nasehat dan pengarahan untuk mengerjakan skripsi ini.
5. Prof. Dr. Sutyarso, M. Biomed, selaku pembahas yang telah memberikan banyak masukan untuk skripsi ini.
6. Dosen-dosen, bapak dan ibu staff administrasi serta seluruh *civitas* akademik Fakultas Kedokteran Unila, terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya selama ini.
7. Kedua orangtuaku tercinta, bapak Mulyono dan Ibu Aminah. Emak dan ayah terimakasih atas semua dukungan, kasih sayang, bimbingan, dan doa-doanya yang tiada henti kepada penulis selama ini.
8. Kakak, abang ipar, dan adikku tersayang, Eka Erviana Sari, S.ST., Yogi Valdanu, dan Febi Zihan Vitara. Terimakasih atas semua dukungan, bimbingan, dan doa-doanya selama ini.
9. Keponakanku tercinta, Ervalda Qaireen Nathisa. Terimakasih selalu memberiku semangat dengan kelucuan dan kegemasan tingkahmu.
10. Sahabatku tersayang, ciwi-ciwi kece, Riestya Abdiana, Fistana Bella Valani dan Titik Herdawati. Terimakasih atas dukungan, semangat juang, doa dan bantuannya dalam penyusunan skripsi ini.

11. Sahabat-sahabat kosan Ratna Itali, Selpina Nopia, Hanifah Sherliana, Caesar Astri Perwitasari, Niswatul Khoriyah, dan Amelia Sabana. Terimakasih atas kegilaan dan kebahagiaan yang diberikan selama ini, canda dan tawa yang selalu buat hubungan kekeluargaan kita menjadi lebih baik.
12. Teman-teman angkatan 2014. Terimakasih atas kebersamaannya selama di FK Unila.
13. Serta semua orang yang tidak penulis sebutkan satu-persatu, penulis mohon maaf, dan terima kasih banyak ikut mendoakan dan menyemangati penulis dalam mengerjakan skripsi ini.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Akan tetapi, penulis berharap semoga skripsi yang sederhana ini dapat berguna dan bermanfaat bagi kita semua. Aaamiiin.

Bandar Lampung, Januari 2018

Popi Zeniusa

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Bagi Peneliti	5
1.4.2 Bagi Masyarakat	5
1.4.3 Bagi Instansi Terkait.....	6
1.4.4 Bagi Peneliti Lain	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Antibiotik	7
2.1.1 Pengertian Antibiotik	7
2.1.2 Penggolongan Antibiotik	8
2.1.2.1 Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Mekanisme Kerja	8
2.1.2.2 Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Daya Kerja.....	11
2.1.2.3 Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Spektrum Kerjanya.....	12
2.2 <i>Escherichia coli</i>	13
2.2.1 Morfologi <i>Escherichia coli</i>	13
2.2.2 Klasifikasi <i>Escherichia coli</i>	14
2.2.3 Struktur Antigen <i>Escherichia coli</i>	15
2.2.4 Patogenesis <i>Escherichia coli</i>	16
2.2.4.1 Patogenesis <i>Escherichia coli</i> di	

Ekstraintestinal	17
2.2.4.1 Patogenesis <i>Escherichia coli</i> di Intraintestinal	18
2.3 Uji Aktivitas Bakteri	21
2.3.4 Metode Difusi	22
2.3.5 Metode Dilusi	23
2.4 Teh Hijau	26
2.4.1 Klasifikasi Tanaman Teh	27
2.4.2 Gambaran Umum Tanaman Teh Hijau	27
2.4.3 Manfaat Teh Hijau	28
2.4.4 Kandungan Teh Hijau	28
2.5 Ekstraksi	31
2.5.1 Definisi Ekstraksi	31
2.5.2 Macam-Macam Ekstrak	33
2.5.3 Tujuan Ekstraksi	34
2.5.4 Macam-Macam Metode Ekstraksi	34
2.5.5 Prinsip Maserasi	36
2.6 Kerangka Teori	37
2.7 Kerangka Konsep	39
2.8 Hipotesis	40

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian	41
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	41
3.2.1 Tempat Penelitian	41
3.2.2 Waktu Penelitian	41
3.3 Populasi dan Sampel	42
3.3.1 Bahan Uji Penelitian	42
3.3.2 Media Kultur	42
3.4 Identifikasi Variabel	42
3.4.1 Variabel Independen	43
3.4.2 Variabel Dependen	43
3.5 Definisi Operasional	44
3.6 Besar Sampel	44
3.7 Kelompok Perlakuan	46
3.8 Diagram Alur Penelitian	47
3.9 Prosedur Penelitian	47
3.9.1 Persiapan	48
3.9.1.1 Alat Penelitian	48
3.9.1.2 Bahan Penelitian	49
3.9.2 Sterilisasi Alat	49
3.9.3 Isolasi dan Uji Identifikasi Bakteri	49
3.9.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Teh Hijau	52
3.9.5 Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan <i>Mc Farland</i>	53
3.9.6 Teknik Pembuatan Suspensi Bakteri	54
3.9.7 Teknik Pembuatan Media Agar MHA (<i>Muller Hinton Agar</i>) untuk Metode Sumuran Kirby Bauer	54

3.9.8 Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau terhadap <i>Escherichia coli</i> secara <i>In Vitro</i> dengan Metode Sumuran Kirby Bauer	55
3.9.9 Pembuatan Media Agar MHA (<i>Muller Hinton Agar</i>) untuk Metode Disk Kirby Bauer	55
3.9.10 Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau terhadap <i>Escherichia coli</i> secara <i>In Vitro</i> dengan Metode Disk Kirby Bauer	56
3.10 Pengolahan dan Analisis Data	57
3.10.1 Pengolahan Data	57
3.10.2 Analisis Data	57
3.10.2.1 Analisis Univariat	57
3.10.2.1 Analisis Bivariat	57
3.11 <i>Dummy Table</i>	59
3.12 <i>Ethical Clearance</i>	59

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian	60
4.1.1 Hasil Isolasi dan Pewarnaan Gram Ulang pada Bakteri Uji	60
4.1.2 Hasil Uji Biokimia Ulang Bakteri Uji	60
4.1.3 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau terhadap <i>Escherichia coli</i>	61
4.2 Hasil Analisis Data	63
4.2.1 Uji Normalitas Data	63
4.2.2 Analisis Univariat	64
4.2.3 Analisis Bivariat	66
4.3 Pembahasan	69

BAB V SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan	77
5.2 Saran	77

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri <i>Escherichia coli</i> terhadap teh hijau	26
2. Definisi operasional variabel dependen dan independen	44
3. Metode pengelompokan perlakuan berdasarkan konsentrasi teh hijau	46
4. Perkiraan zona hambat ekstrak etanol teh hijau terhadap pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> secara <i>in vitro</i>	59
5. Hasil isolasi dan pewarnaan Gram ulang pada bakteri <i>Escherichia coli</i>	60
6. Identifikasi ulang bakteri <i>Escherichia coli</i> dengan uji biokimia	61
7. Hasil pengukuran diameter zona hambat (mm) pada <i>Escherichia coli</i>	62
8. Hasil uji normalitas diameter zona hambat pada konsentrasi yang berbeda	63
9. Hasil analisis univariat diameter zona hambat.....	65
10. Nilai p-value Hasil Uji <i>Post Hoc Mann-Whitney</i> antarkelompok....	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Escherichia coli</i> pembesaran 1000x	14
2. Daun <i>Camellia sinensis</i>	27
3. Struktur kimia katekin teh hijau	31
4. Kerangka teori	39
5. Alur penelitian uji daya hambat ekstrak etanol teh hijau terhadap <i>Escherichia coli</i> secara <i>in vitro</i>	47

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Infeksi merupakan salah satu penyebab utama penyakit di dunia terutama di negara berkembang seperti Indonesia. Indonesia termasuk salah satu negara beriklim tropis dengan keadaan berdebu serta temperatur yang hangat dan lembab sehingga mendukung mikroba untuk terus berkembang biak dan pada akhirnya dapat menyebabkan infeksi (Erwiyani, 2009). Penelitian pada bidang kesehatan menunjukkan banyak terdapat infeksi seperti pada saluran pernafasan dan pencernaan yang disebabkan oleh bakteri (Indang *et al.*, 2013). Salah satu bakteri yang sering menjadi penyebab utama infeksi adalah *Escherichia coli*. *Escherichia coli* merupakan salah satu jenis bakteri Gram negatif yang secara normal hidup dalam saluran pencernaan manusia. Namun, apabila dipengaruhi oleh faktor-faktor predisposisi, *Escherichia coli* akan menjadi bakteri patogen dalam tubuh dan dapat menyebabkan terjadinya infeksi (Erwiyani, 2009; Waluyo, 2012).

Pengobatan infeksi dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik. Antibiotik merupakan senyawa alami maupun sintetik yang mempunyai efek menekan atau menghentikan proses biokimiawi di dalam organisme,

khususnya dalam proses infeksi oleh bakteri (Soleha, 2015). Namun, suatu penelitian kualitatif menunjukkan penggunaan antibiotik di berbagai rumah sakit di Indonesia ditemukan 30% sampai 80% tidak didasarkan pada indikasi. Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi inilah yang dapat menimbulkan berbagai permasalahan dan menjadi ancaman global bagi kesehatan terutama menimbulkan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik tertentu (Kemenkes, 2011).

Penyakit infeksi oleh bakteri resisten akan menyebabkan berbagai efek negatif seperti sulitnya proses penyembuhan sehingga perlu penggunaan antibiotik dosis tinggi, peningkatan biaya pengobatan serta meningkatkan risiko kematian (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). Hal inilah yang menarik minat untuk menemukan agen antibiotik dari ekstrak tanaman yang perlu dikembangkan sebagai alternatif antibiotik baru terhadap antibiotik yang sudah resisten. Salah satu tanaman yang selama ini dikenal memiliki manfaat sebagai antibiotik adalah teh (*Camellia sinensis* L.) (Reygaert dan Jusufi, 2013).

Berdasarkan data produksi teh global tahun 2015, Indonesia berada pada urutan ke tujuh setelah Cina, India, Kenya, Sri Langka, Turki dan Vietnam sebagai negara penghasil teh terbesar di dunia (*International Tea Committee/ITC*, 2015). Banyaknya produksi teh di Indonesia, telah menjadikan teh sebagai minuman populer bagi masyarakat. Selain itu, teh juga dipercaya masyarakat mempunyai banyak manfaat bagi kesehatan (Kassem, 2008).

Berdasarkan proses fermentasinya, teh dapat dibedakan menjadi beberapa macam, yaitu teh hitam, teh merah (teh Oolong), dan teh hijau. Teh hitam dihasilkan melalui proses fermentasi sempurna, teh merah (teh Oolong) melalui proses semi fermentasi, sedangkan teh hijau diperoleh tanpa proses fermentasi (Marie *et al.*, 2005). Berdasarkan beberapa penelitian terhadap jenis-jenis teh tersebut, teh hijau telah terbukti dapat mempertahankan berbagai kandungan nutrisi yang lebih besar dibandingkan teh hitam maupun teh merah (Mahmood *et al.*, 2010; Adriani, 2010). Selain itu, berdasarkan penelitian lain diketahui pula bahwa teh hijau mempunyai kemampuan membunuh bakteri hingga tiga kali lipat dengan efek samping minimal sehingga dapat digunakan sebagai antibiotik alternatif terhadap bakteri resisten (Kassem, 2008).

Komponen dalam teh hijau yang bertanggung jawab dalam memberikan kontribusi positif bagi kesehatan adalah polifenol. Bukti penelitian melaporkan bahwa kandungan polifenol pada daun teh hijau lebih tinggi dibanding teh hitam. Persentase kandungan polifenol pada daun teh hijau sebanyak 30-40 %, sedangkan persentase kandungan polifenol pada daun teh hitam sebanyak 3-10 %. Polifenol yang paling penting yaitu flavonoid dan flavonoid utama dalam teh adalah flavanols (katekin). Katekin dalam teh hijau terdiri dari empat jenis, yaitu *epicatechin* (EC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), dan *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) (Reygaert dan Jusufi, 2013; Anindita, 2012).

Senyawa polifenol di dalam teh sebagian besar merupakan senyawa golongan flavonoid subgolongan flavan-3-ol dan flavonol. Banyaknya gugus hidroksi pada senyawa polifenol mengakibatkan senyawa polifenol ini cenderung bersifat polar sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti etanol dan air. Hal inilah yang menjadi dasar pembuatan ekstrak etanol teh hijau dan diharapkan senyawa polifenol yang terdapat di dalam teh hijau dapat tersari secara optimal (Kuntari, 2007).

Berdasarkan uraian tersebut, diketahui bahwa resistensi antibiotik telah menjadi masalah dunia. Oleh karena itu, diperlukan suatu alternatif lain untuk antibiotik yang telah resisten. Salah satu alternatif tersebut dapat berasal dari ekstrak tanaman yang telah terbukti memiliki manfaat sebagai antibiotik. Tanaman yang memiliki efek antibiotik tersebut salah satunya adalah teh hijau, sehingga hal inilah yang mendasari peneliti untuk melakukan penelitian yang berjudul “Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau terhadap *Escherichia coli* secara *In Vitro*”.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat daya hambat ekstrak etanol teh hijau terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *in vitro*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui daya hambat ekstrak etanol teh hijau terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa ekstrak etanol teh hijau dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.
2. Mengetahui konsentrasi ekstrak etanol teh hijau yang efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Peneliti

Menambah pengetahuan dan pengalaman dalam melakukan penelitian terutama yang berkaitan dengan bidang mikrobiologi klinik serta menambah wawasan peneliti mengenai efek tanaman teh hijau yang memiliki manfaat sebagai antibiotik.

1.4.2 Bagi Masyarakat

Memberi informasi kepada masyarakat mengenai tanaman teh hijau yang memiliki manfaat sebagai antibiotik sehingga masyarakat dapat memanfaatkan tanaman tersebut sebagai salah satu antibiotik alami.

1.4.3 Bagi Instansi Terkait

Hasil penelitian diharapkan dapat dijadikan sebagai tambahan informasi dan masukan untuk pengembangan bahan obat alami untuk penyakit infeksi.

1.4.4 Bagi Peneliti Lain

Dapat memberikan informasi ilmiah mengenai manfaat teh hijau sebagai bahan rujukan atau referensi untuk penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Antibiotik

2.1.1 Pengertian Antibiotik

Antibiotik berasal dari kata Yunani tua, yang merupakan gabungan dari kata anti (lawan) dan bios (hidup), sehingga jika diterjemahkan bebas menjadi "melawan sesuatu yang hidup". Antibiotik di dunia kedokteran digunakan sebagai obat untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Antibiotik yang digunakan untuk membasmi bakteri, khususnya penyebab infeksi pada manusia, harus memiliki sifat toksisitas selektif yang setinggi mungkin. Artinya, antibiotik tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk bakteri, tetapi relatif tidak toksik untuk penggunaannya (Bobone *et al.*, 2013).

2.1.2 Penggolongan Antibiotik

2.1.2.1 Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Mekanisme Kerja

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibiotik dibagi dalam lima kelompok (Hendrayati, 2012; Setiabudy, 2007c):

- a. Antibiotik yang menghambat metabolisme sel bakteri.

Antibiotik yang masuk dalam kelompok ini ialah Sulfonamid, Trimetropim, Asam p-aminosalisilat (PAS) dan Sulfon. Mekanisme kerja dari obat-obat ini bersifat bakteristatik. Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan manusia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri *Para Amino Benzoic Acid* (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila Sulfonamid atau Sulfon menang bersaing dengan PABA untuk dilibatkan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya kehidupan bakteri akan terganggu. Berdasarkan sifat kompetisi, efek Sulfonamid dapat diatasi dengan kadar PABA.

- b. Antibiotik yang menghambat sintesis dinding sel bakteri.

Obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah Penisilin, Sefalosporin, Basitrasin, Vankomisin, dan

Sikloserin. Dinding sel bakteri terdiri dari polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Sikloserin menghambat reaksi yang paling dini dalam proses sintesis dinding sel, diikuti berturut-turut oleh Basitrasin, Vankomisin, Penisilin dan Sefalosporin yang terakhir dalam rangkaian tersebut. Oleh karena tekanan osmotik dalam sel kuman lebih tinggi daripada di luar sel maka kerusakan dinding sel kuman akan menyebabkan terjadinya lisis, yang merupakan dasar efek bakterisidal pada kuman yang sensitif.

- c. Antibiotik yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri.

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah Polimiksin, golongan polien serta berbagai antibiotik kemoterapeutik, misalnya antiseptik *surface active agents*. Polimiksin sebagai senyawa amonium-kuaterner dapat merusak membran sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lainnya.

- d. Antibiotik yang menghambat sintesis protein sel bakteri.

Obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah golongan Aminoglikosid, Makrolid, Linkomisin, Tetrasiklin, dan Kloramfenikol. Untuk kehidupannya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri dari dua subunit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Eritromisin berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya, rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang, karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru. Kloramfenikol berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat pengikatan asam amino baru pada rantai polipeptida oleh enzim peptidil transferase.

- e. Antibiotik yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.

Antibiotik yang termasuk dalam kelompok ini ialah Rifamfisin dan golongan Kuinolon. Rifampisi, salah satu derivat rifamfisin, berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Golongan kuinolon menghambat enzim DNA girase pada kuman yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa muat dalam sel kuman yang kecil.

2.1.2.2 Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Daya Kerja

Berdasarkan daya kerjanya, antibiotik dibedakan menjadi:

- a. Bakterisidal

Antibiotik yang secara aktif membunuh kuman. Termasuk dalam golongan ini adalah Penisilin, Sefalosporin, Aminoglikosida (dosis besar), Kotrimoksazol, Polipeptida, Rifampisin, dan Isoniazid.

- b. Bakteriostatik

Antibiotika bakteriostatik bekerja dengan mencegah atau menghambat pertumbuhan kuman, tidak membunuhnya, sehingga pembasmian kuman sangat

tergantung pada daya tahan tubuh. Termasuk dalam golongan ini adalah Sulfonamida, Tetrasiklin, Kloramfenikol, Eritromisin, Trimetropim, Inkomisin, Makrolida, Klindamisin, dan Asam para-aminosalisilat.

2.1.2.3 Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Spektrum

Kerjanya

Berdasarkan spektrum kerjanya, antibiotik dibedakan menjadi:

a. Spektrum luas (aktivitas luas)

Antibiotik yang bersifat aktif bekerja terhadap banyak jenis bakteri yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Contoh antibiotik dalam kelompok ini adalah Sulfonamid, Ampisilin, Sefalosforin, Kloramfenikol, Tetrasiklin, dan Rifampisin.

b. Spektrum sempit (aktivitas sempit)

Antibiotik yang bersifat aktif bekerja hanya terhadap beberapa jenis bakteri saja, bakteri Gram positif atau Gram negatif saja. Contohnya Eritromisin, Klindamisin, Kanamisin, hanya bekerja terhadap bakteri Gram positif, sedangkan Streptomisin, Gentamisin, hanya bekerja terhadap kuman Gram negatif.

2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) adalah bakteri Gram negatif yang tumbuh sebagai flora normal pada usus manusia yang berperan penting dalam sintesis vitamin K, konversi pigmen-pigmen empedu, asam-asam empedu, dan penyerapan zat-zat makanan. Namun dapat menjadi patogen jika jumlah bakteri ini dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus (Kusuma, 2010).

2.2.1 Morfologi *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bagian famili Enterobacteriaceae, berbentuk batang pendek (*coccobasil*), Gram negatif, ukuran 0,4-0,7 μm x 1,4 μm , beberapa strain memiliki kapsul dan tidak membentuk spora serta bersifat anaerob fakultatif, kebanyakan bersifat motil (dapat bergerak) dengan menggunakan flagella (Brooks *et al.*, 2013). *Escherichia coli* dapat tumbuh di media manapun. Sebagian besar strain *Escherichia coli* bersifat mikroaerofilik yaitu butuh oksigen namun tanpa oksigen masih dapat hidup. Beberapa strain lainnya bersifat hemolisis sehingga ketika ditanam di media agar darah akan terlihat hemolisis β (hemolisis total) sedangkan jika ditanam di media *Eosin Methylen Blue* (EMB) akan tampak warna yang khas yaitu hijau metalik dan akan terlihat koloni berwarna kilat logam jika ditanam dalam media Endo Agar (Nygren *et al.*, 2012).

Selain itu, *Escherichia coli* juga 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).

Escherichia coli yang patogen dapat hidup optimal pada suhu 37°C, serta dalam kisaran pH 4,4-8,5. Nilai aktivitas air minimal 0,95 lebih resistensi terhadap asam. Bakteri ini relatif sangat sensitif terhadap panas dan inaktif pada suhu pasteurisasi atau selama pemasakkan makanan (Suardana dan Swarcita, 2009).



Gambar 1. *Escherichia coli* pembesaran 1000x (Brooks *et al.*, 2013).

2.2.2 Klasifikasi *Escherichia coli*

Menurut Bergey's *Manual of Systemic Biology* dalam Jawetz *et al.*, 2008, klasifikasi taksonomi *Escherichia coli*:

Kingdom	: Bacteria
Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Struktur dinding sel bakteri Gram negatif relatif lebih kompleks tersusun atas tiga lapisan yakni lapisan luar yang berupa lipoprotein, lapisan tengah berupa lipopolisakarida dan lapisan dalam berupa peptidoglikan (Purwani *et al.*, 2009). Peptidoglikan yang terkandung dalam bakteri Gram negatif memiliki struktur lebih kompleks dibandingkan Gram positif. Membran luarnya terdiri dari lipid, liposakarida, dan protein (Febrika, 2012). Membran luar bakteri Gram negatif berhubungan dengan lingkungan termasuk pada pejamu manusia. Variasi pada membran luar inilah yang menyebabkan terdapatnya perbedaan sifat patogenitas dan resistensi antibiotik (Hendrayati, 2012).

2.2.3 Struktur Antigen *Escherichia coli*

Escherichia coli yang merupakan anggota dari *Enterobacteriaceae* memiliki struktur antigenik yang terdiri dari (Brooks *et al.*, 2008; Hendrayati, 2012):

a. Antigen somatik O (liposakarida)

Antigen O adalah bagian luar dari lipopolisakarida dinding sel dan terdiri dari unit polisakarida yang berulang. Beberapa polisakarida spesifik mengandung gula yang unik. Antigen O resisten terhadap panas dan alkohol dan biasanya terdeteksi oleh aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O adalah IgM. Pada *Escherichia coli*, antigen O spesifik ditemukan pada diare dan infeksi saluran kemih.

b. Antigen K (kapsular)

Antigen K terletak di luar antigen O. Pada *Escherichia coli* antigen K merupakan polisakarida yang dapat mengganggu aglutinasi dengan antiserum O dan dapat berhubungan dengan virulens misalnya antigen K pada *E. coli* menyebabkan perlekatan bakteri pada sel epitel sebelum invasi ke saluran cerna atau saluran kemih.

c. Antigen H (flagella)

Antigen H terdapat di flagella dan didenaturasi oleh panas atau alkohol. Antigen H dipertahankan dengan memberikan formalin pada varian bakteri yang bergerak. Penentu dalam antigen H adalah fungsi sekuens asam amino pada protein flagel (*flagelin*).

2.2.4 Patogenesis *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan flora normal yang ada di dalam kolon manusia. Umumnya *E. coli* tidak menyebabkan

suatu penyakit pada manusia tetapi pada beberapa kondisi tertentu, bakteri *E. coli* dapat menimbulkan penyakit yaitu bila jumlah koloni terlalu banyak, *E. coli* hidup di luar habitatnya atau keadaan manusia sebagai pejamu yang lemah karena suatu kondisi seperti mengalami penyakit immunosupresan (Putri, 2015).

2.2.4.1 Patogenesis *Escherichia coli* di Ekstraintestinal

Pada patogenesis ekstraintestinal, *E. coli* dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, sepsis, dan penyakit lainnya. Pada infeksi saluran kemih, *E. coli* menjadi penyebab tersering dengan prevalensi mencapai 90% terutama pada penderita wanita. Gejala dan tandanya infeksi saluran kemih yaitu sering berkemih, disuria, hematuria, dan piuria. Pada infeksi saluran kemih yang letaknya dibagian atas maka akan timbul pula gejala nyeri pinggang dan demam yang sangat tinggi yaitu mencapai lebih dari sama dengan 39°C. Antigen yang cukup berperan dalam infeksi saluran kemih bagian atas yaitu antigen K, sedangkan antigen O hampir berperan pada seluruh infeksi. Antigen H berperan pada kejadian nefropatogenik akibat infeksi *E. coli* (Jawetz *et al.*, 2008).

Selain infeksi saluran kemih, *E. coli* juga dapat menyebabkan sepsis yang dapat mengancam nyawa. *E.*

coli menjadi penyebab sepsis nosokomial yang cukup tinggi yaitu prevalensinya mencapai 15%. Sepsis akibat *E. coli* sebagian besar diakibatkan oleh endotoksin kelompok *Sepsis Enteropathogenesis E. coli* (SEPEC) yang rata-rata menunjukkan resistensi. Pada infeksi lainnya, *E. coli* dapat pula menyebabkan infeksi vesica vellea serta duktus, apendisitis dan meningitis pada bayi prematur (Putri, 2015).

2.2.4.2 Patogenesis *Escherichia coli* di Intraintestinal

Pada intestinal, *Escherichia coli* sering menyebabkan penyakit diare. Diare yang disebabkan oleh *E. coli* sangat beragam macamnya, bergantung dari jenis maupun gejala klinis yang timbul. Perbedaan tersebut terjadi karena *E. coli* memiliki beberapa kelompok dengan kemampuan virulensi yang berbeda-beda berdasarkan dari endotoksi yang dihasilkan (Jawetz *et al.*, 2008).

Endotoksin dari strain *E.coli* yang patogen dapat menyebabkan diare berat pada semua kelompok usia. Endotoksin strain *E. coli* yang dihubungkan dengan diare yaitu:

a. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC)

Menyebabkan diare pada bayi dan anak di negara berkembang. Jenis diare yang ditimbulkan yaitu diare encer yang dapat sembuh sendiri tetapi dapat menjadi kronik. Mekanisme EPEC dapat menimbulkan manifestasi yaitu mulanya EPEC menempel pada mukosa intestinal lalu dibantu dengan kromosom pada EPEC, maka perlekatan akan semakin meningkat dan mengakibatkan rusaknya mikrovili yang ada pada mukosa intestinal.

b. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC)

ETEC adalah penyebab umum terjadinya “diare wisatawan” dan juga penyebab diare yang sangat penting pada bayi di negara berkembang. Strain bakteri ini menghasilkan toksin LT (termolabil) dan toksin ST (termostabil) saat bakteri ini melekat pada mukosa usus manusia sehingga menyebabkan *secretory diarrhea* seperti pada kolera. Toksin yang dihasilkan akan masuk ke mukosa intestinal lalu mempengaruhi fungsi sel dengan cara aktivasi adenilil siklase lalu setelah itu akan meningkatkan konsentrasi cAMP lokal. Konsentrasi cAMP yang meningkat akan mengakibatkan hipersekresi air dan klorida yang banyak dan lama. Akibat hipersekresi tersebut maka

fungsi reabsorpsi natrium dan juga membuat intestinal teregang, akibat peregangan tersebut maka akan terjadi hipermotilitas maka terjadilah diare.

c. *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC)

Menimbulkan penyakit diare disentri yang mirip seperti shigelosis. EIEC menimbulkan penyakit dengan cara menginvasi sel epitel mukosa intestinal sehingga menimbulkan lesi inflamasi dan juga ulkus. Penyakit ini terjadi paling sering pada anak-anak di negara berkembang dan pada pengunjung negara-negara tersebut. Seperti *Shigella*, strain EIEC tidak memfermentasikan laktosa atau memfermentasi laktosa dengan lambat dan nonmotil.

d. *Enteroadgregative Escherichia coli* (EAEC)

EAEC dapat menyebabkan diare akut dan kronik dengan durasi rata-rata >14 hari dan sering terjadi pada masyarakat di negara berkembang. EAEC juga menyebabkan penyakit yang ditularkan melalui makanan di negara industri. Mekanisme EAEC hingga sampai menimbulkan manifestasi yaitu dibantu dengan fimbri, organisme ini melekat pada sel epitel mukosa intestinal lalu mengeluarkan toksin yang hampir serupa dengan tipe SL dan hemolisin. Ciri diare yang

ditimbulkannya yaitu *watery diarrhea* dan bahkan hingga diare berdarah.

e. *Enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC)

Strain bakteri ini menghasilkan verotoksin sehingga menyebabkan kolitis hemoragik (diare berdarah).

Jumlah koloni O157:H7 yang dapat menimbulkan gejala penyakit cukup rendah yaitu 101/g –102/g dan umumnya menyerang kelompok balita, manula, dan orang yang memiliki kekebalan tubuh rendah. Sanitasi yang baik, memasak daging sapi sampai suhu 65°C dan menyimpan panganan di lemari es pada suhu 4°C atau kurang adalah cara untuk mengontrol *E.coli* (Jawetz *et al.*, 2008; Standar Nasional Indonesia, 2009).

2.3 Uji Aktivitas Bakteri

Penentuan aktivitas antibiotik dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode difusi dan dilusi (Brooks *et al.*, 2008). Metode difusi terdiri dari metode *Cup-plate technique*, *disk diffusion* (tes Kirby dan Baur), *E-test*, dan *ditch-plate technique*, sedangkan metode dilusi terdiri dari metode dilusi cair dan dilusi padat (Pratiwi, 2008).

2.3.1 Metode Difusi

Pada metode ini yang diamati adalah diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri karena difusinya obat pada titik awal pemberian ke daerah difusi. Metode ini dilakukan dengan cara menanam bakteri pada media agar padat tertentu kemudian diletakkan kertas samir atau disk yang mengandung obat dan dilihat hasilnya. Diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur sebagai kekuatan inhibisi obat melawan bakteri yang diuji (Brooks *et al.*, 2008).

Metode difusi dibagi menjadi beberapa cara :

a. *Cup-plate technique*

Metode ini serupa dengan *disk diffusion* dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan bakteri dan pada sumur tersebut diberi agen antibiotik yang akan diuji. Kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, amati zona hambat di sekitar sumur tersebut (Pratiwi, 2008).

b. Metode *disk diffusion* (tes Kirby dan Baur)

Metode ini Menggunakan cakram kertas yang berisi agen antibiotik, kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanami bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, sehingga agen antibakteri dapat berdifusi pada media agar tersebut. Lalu amati zona hambatnya (area jernih) dengan mengukur besarnya diameter daya hambat

yang terbentuk di sekitar cakram kertas antibiotik tersebut. Semakin besar diameter hambat yang terbentuk, semakin besar pula sensitifitas antibiotiknya (Pelczar dan Chan, 2007).

c. *Metode E-test*

Metode ini digunakan untuk mengestimasi Kadar Hambat Minimum (KHM), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antibiotik untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antibiotik dari kadar terendah sampai tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami bakteri sebelumnya (Pratiwi, 2008).

d. *Ditch-plate technique*

Pada metode ini sampel uji berupa agen antibiotik yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan bakteri uji digoreskan ke arah parit yang berisi agen antibiotik tersebut. Lalu inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian perhatikan zona hambatnya (Prayoga, 2013).

2.3.2 Metode Dilusi

Metode dilusi adalah metode yang digunakan untuk mengukur Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari antibiotik yang diuji. Metode ini menggunakan prinsip pengenceran

antibiotik sehingga diperoleh beberapa konsentrasi obat yang ditambah suspensi bakteri dalam media. Dalam metode ini, seri tabung reaksi akan diisi media cair dan beberapa sel bakteri yang akan diuji, lalu dilakukan pengenceran secara serial dengan konsentrasi tertentu, selanjutnya diisi dengan antibiotik yang akan diujikan, kemudian seri tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian amati kekeruhan yang terjadi pada serial tabung tersebut (Prayoga, 2013).

Hasil KHM akan menunjukkan konsentrasi terendah jika tabung yang diamati adalah tabung dengan kejernihan paling baik (indikator tidak terdapat pertumbuhan bakteri). Selanjutnya, hasil biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar. Kemudian, media agar tersebut diinkubasi dan lihat ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh, sedangkan hasil KBM adalah ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh pada media agar yang telah diinkubasi (Setiabudy, 2012).

Pada metode ini yang diamati adalah ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri, jika ada diamati tingkat kesuburan dari pertumbuhan bakteri dengan cara menghitung jumlah koloni (Pratiwi, 2008). Tujuan akhirnya adalah untuk mengetahui seberapa banyak jumlah zat antibiotik yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri yang diuji (Brooks *et al.*, 2008).

Metode dilusi dibedakan menjadi dua, yaitu:

a. Metode dilusi cair (*Broth Dilution Test*)

Metode ini digunakan untuk mengukur Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antibiotik pada medium cair yang ditambahkan dengan bakteri uji. Larutan uji agen antibiotik pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun agen antibiotik, dan diinkubasi selama 18 – 24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Prayoga, 2013).

b. Metode dilusi padat (*Solid Dilution Test*)

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat. Pada dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampurkan dengan media agar lalu ditanami bakteri dan diinkubasi. Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antibiotik yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa bakteri uji (Pratiwi, 2008).

Tabel 1. Klasifikasi respon hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* terhadap teh hijau (Rundengan *et al*, (2017))

Diameter zona hambat	Respon hambatan pertumbuhan
>20 mm	Sangat kuat
11-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Lemah

2.4 Teh Hijau

Teh hijau adalah teh yang dalam proses pembuatannya tidak mengalami fermentasi (oksidasi enzimatis) artinya yaitu dibuat dengan cara menginaktifkan enzim fenolase yang ada dalam pucuk daun teh segar, melalui pemanasan sehingga oksidasi terhadap katekin (zat antioksidan) dapat dicegah. Teh hijau dapat diperoleh melalui pemanasan (udara panas) dan penguapan. Pemanasan dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan udara kering (pemanggangan/sangrai) dan udara basah dengan uap panas (*steam*). Pemanggangan daun teh akan memberikan aroma dan rasa yang lebih kuat dibandingkan dengan pemberian uap panas. Kedua metode tersebut berguna untuk mencegah terjadinya oksidasi enzimatis katekin. Keuntungan dengan cara pemberian uap panas, adalah warna teh dan seduhannya akan lebih hijau terang (Saraswati, 2015).



Gambar 2. Daun *Camellia sinensis* (Kress, 2011)

2.4.1 Klasifikasi Tanaman Teh

Devisi	: Spermatophyta
Kelas	: Angiospermae
Sub kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Guttiferales
Famili	: Camelliaceae
Genus	: <i>Camellia</i>
Spesies	: <i>Camellia sinensis</i> L. (Tuminah, 2007)

2.4.2 Gambaran Umum Tanaman Teh Hijau

Teh hijau ini merupakan famili dari Theacea. Tanaman ini merupakan pohon kecil berukuran paling tinggi 30 kaki yang biasa dipangkas 2-5 kaki bila dibudidayakan untuk dipanen daunnya. Tanaman ini juga memiliki akar tuggang yang kuat. Daun teh hijau memiliki panjang 4-15 cm dan lebar 2-5 cm. Daun muda yang bewarna hijau muda lebih disukai untuk peroduksi teh. Sedangkan daun tua dari teh hijau bewarna lebih gelap. Daun dengan umur

yang berbeda akan menghasilkan kualitas teh yang berbeda-beda, karena komposisi kimianya yang berbeda. Bagian dari daun teh yang di panen untuk di proses menjadi teh adalah pucuk dan dua hingga tiga daun pertama (Saraswati, 2015).

2.4.3 Manfaat Teh Hijau

Beberapa penelitian terbaru menyatakan bahwa teh hijau memiliki beberapa manfaat antara lain sebagai antikanker, antibakteri, menurunkan kolesterol, serta meningkatkan kekebalan tubuh (Murase *et al.*, 2009).

2.4.4 Kandungan Teh Hijau

Teh hijau terdiri atas kandungan kimia yang kompleks. Teh mengandung alkaloid, saponin, tanin, protein, asam amino dan polifenol yang terdiri dari flavonol, flavanol, flavone, flavavone, isoflavone, antocyanin. Selain itu, teh hijau juga terdapat unsur karbohidrat seperti selulose, glukosa, pektin dan fruktosa, serta mengandung berbagai macam mineral dan vitamin (B, C dan E), lipid, pigmen berupa klorofil dan enzim-enzim yang berperan sebagai katalisator contohnya enzim amilase, protease, peroksidase (Saraswati, 2015).

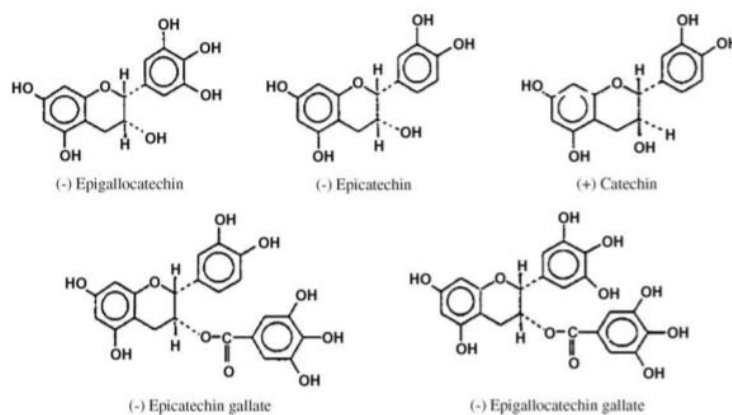
Komponen medis yang penting dari teh hijau adalah polifenol. Polifenol yang paling banyak ditemukan dalam teh hijau adalah

flavanol, yaitu katekin. Katekin dalam teh hijau terdiri atas *epigallocatechin-3 gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC). Dalam teh hijau, EGCG merupakan kandungan yang paling tinggi, yaitu sekitar 59% dari total katekin. Kemudian EGC sekitar 19%, ECG, 13,6%; dan EC sebesar 6,4% (Jigisha *et al.*, 2012). Selain flavanol, flavonol juga ditemukan di dalam daun teh yang terdiri dari quercetin, kaemferol, dan myricetin (Reygaert, 2014).

Agar komponen teh hijau bermanfaat bagi kesehatan, komponen-komponen tersebut harus memiliki bioavailabilitas yang pada umumnya dinilai dengan mengukur plasma, urin, dan mungkin pada tingkat jaringan. Biasanya dengan mengambil sampel dengan interval waktunya secara teratur. Dari berbagai penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa ECG, EGCG, metabolit dari EC dan EGC dapat terdeteksi dalam plasma darah, namun metabolit dari EC dan EGC juga dapat dideteksi dalam urin. Konsentrasi puncak dalam plasma darah terjadi pada sekitar 2 jam setelah konsumsi, dan puncak konsentrasi dalam urin terjadi sekitar 4-6 jam setelah konsumsi. Beberapa penelitian yang dilakukan menggunakan berbagai dosis, menunjukkan bahwa bioavailabilitas dari katekin sebanding dengan jumlah yang dikonsumsi (Stalmach *et al.*, 2009; Clifford *et al.*, 2013).

Berdasarkan penelitian, katekin terutama *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) yang terkandung dalam teh hijau diketahui memiliki efek sebagai bakteriostatik atau bakterisid tergantung konsentrasinya. EGCG bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri dan membran sitoplasmanya sehingga menyebabkan denaturasi protein (Saraswati, 2015).

Selain itu, Quercetin juga telah diketahui memiliki efek dalam membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri, yaitu dengan cara menghambat DNA girase, sehingga menghentikan proses pembentukan DNA untai ganda pada bakteri. Selain EGCG dan Quercetin, teh hijau juga mengandung tanin yang telah diketahui memiliki efek sebagai antibiotik. Tanin mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengkoagulasi protein protoplasma bakteri, sehingga terjadi denaturasi pada protein tersebut dan pada akhirnya akan menyebabkan lisisnya bakteri (Kohanski *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2009; Pratiwi, 2008).



Gambar 3. Struktur kimia katekin teh hijau
(Sumber: Mahmood, *et al.*, 2010).

2.5 Ekstraksi

2.5.1 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian senyawa-senyawa yang terdapat di dalam tanaman yang digunakan cairan penyari yang sesuai dengan cara yang tepat. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan komponen yang berada dalam campuran secara selektif dengan pelarut yang sesuai. Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan yang polar, pelarut semipolar melarutkan senyawa semipolar, dan pelarut nonpolar melarutkan senyawa nonpolar. Sediaan yang diperoleh dari hasil ekstraksi dinamakan ekstraksi, pelarutnya disebut penyari, sedangkan sisa-sisa yang tidak ikut tersari disebut ampas (Yuwono, 2009).

Dalam proses ekstraksi, ada beberapa hal yang perlu diperhatikan antara lain:

1. Jumlah simplisia yang akan diekstrak
2. Derajat kehalusan simplisia

Semakin halus, luas kontak permukaan akan semakin besar sehingga proses ekstraksi akan lebih optimal.

3. Jenis pelarut yang digunakan

Jenis pelarut berkaitan dengan polaritas dari pelarut tersebut. Hal yang perlu diperhatikan dalam proses ekstraksi adalah senyawa yang memiliki kepolaran yang sama akan lebih mudah tertarik/terlarut dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama. Berkaitan dengan polaritas dari pelarut, terdapat tiga golongan pelarut yaitu:

a. Pelarut polar

Memiliki tingkat kepolaran yang tinggi, cocok untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang polar dari tanaman. Pelarut polar cenderung universal digunakan karena biasanya walaupun polar, tetap dapat menyari senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran lebih rendah. Salah satu contoh pelarut polar adalah: air, metanol, etanol, asam asetat.

b. Pelarut semipolar

Pelarut semipolar memiliki tingkat kepolaran yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut polar. Pelarut ini baik untuk mendapatkan senyawa-senyawa semipolar dari tumbuhan. Contoh pelarut ini adalah: aseton, etil asetat, kloroform.

c. Pelarut nonpolar

Pelarut nonpolar, hampir sama sekali tidak polar. Pelarut ini baik untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang sama sekali tidak larut dalam pelarut polar. Senyawa ini baik untuk mengekstrak berbagai jenis minyak. Contoh: heksana, eter (Siswoyo, 2009).

Beberapa syarat-syarat pelarut yang ideal untuk ekstraksi antara lain:

- a. Tidak toksik dan ramah lingkungan
 - b. Mampu mengekstrak semua senyawa dalam simplisia
 - c. Mudah untuk dihilangkan dari ekstrak
 - d. Tidak bereaksi dengan senyawa-senyawa dalam simplisia yang diekstrak
 - e. Murah/ekonomis.
4. Lama waktu ekstraksi

Lama ekstraksi akan menentukan banyaknya senyawa-senyawa yang terambil. Ada waktu saat pelarut/ekstraktan jenuh. Sehingga, semakin lama ekstraksi semakin bertambah banyak ekstrak yang didapatkan.

2.5.2 Macam-Macam Ekstrak

Berdasarkan sifatnya, ekstrak dapat dibedakan menjadi beberapa macam, yaitu:

a. Ekstrak encer

Sediaan ini mempunyai konsistensi seperti madu.

b. Ekstrak kental

Sediaan ini liat pada kondisi dingin dan tidak dapat dituang, kandungan air sekitar 30%.

c. Ekstrak kering

Sediaan ini mempunyai konsentrasi kering dan mudah digosongkan, kandungan air tidak lebih dari 5% (Yuwono, 2009).

2.5.3 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antarmuka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Saraswati, 2015).

2.5.4 Macam-Macam Metode Ekstraksi

Adapun metode dari ekstraksi dibagi menjadi dua, yaitu:

1. Cara dingin

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Cairan penyari

akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel maka larutan terpekat didesak keluar.

b. Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat).

2. Cara panas

a. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.

b. Sokletasi

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

c. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan terus menerus) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50⁰C.

d. Infundasi

Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya dilakukan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Proses ini dilakukan pada suhu 90⁰C selama 15 menit.

e. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air, yakni 30 menit pada suhu 90-100⁰C (Saraswati, 2015).

2.5.4 Prinsip Maserasi

Penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai pada temperature kamar, terlindung dari cahaya. Cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di

luar sel dan di dalam sel. Keuntungan dari metode maserasi adalah peralatan yang digunakan sederhana, sedangkan kerugiannya adalah waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi sampel cukup lama, cairan penyari yang digunakan lebih banyak, tidak dapat digunakan untuk bahan-bahan yang mempunyai tekstur keras seperti benzoin, tiraks dan lilin (Saraswati, 2015).

2.6 Kerangka Teori

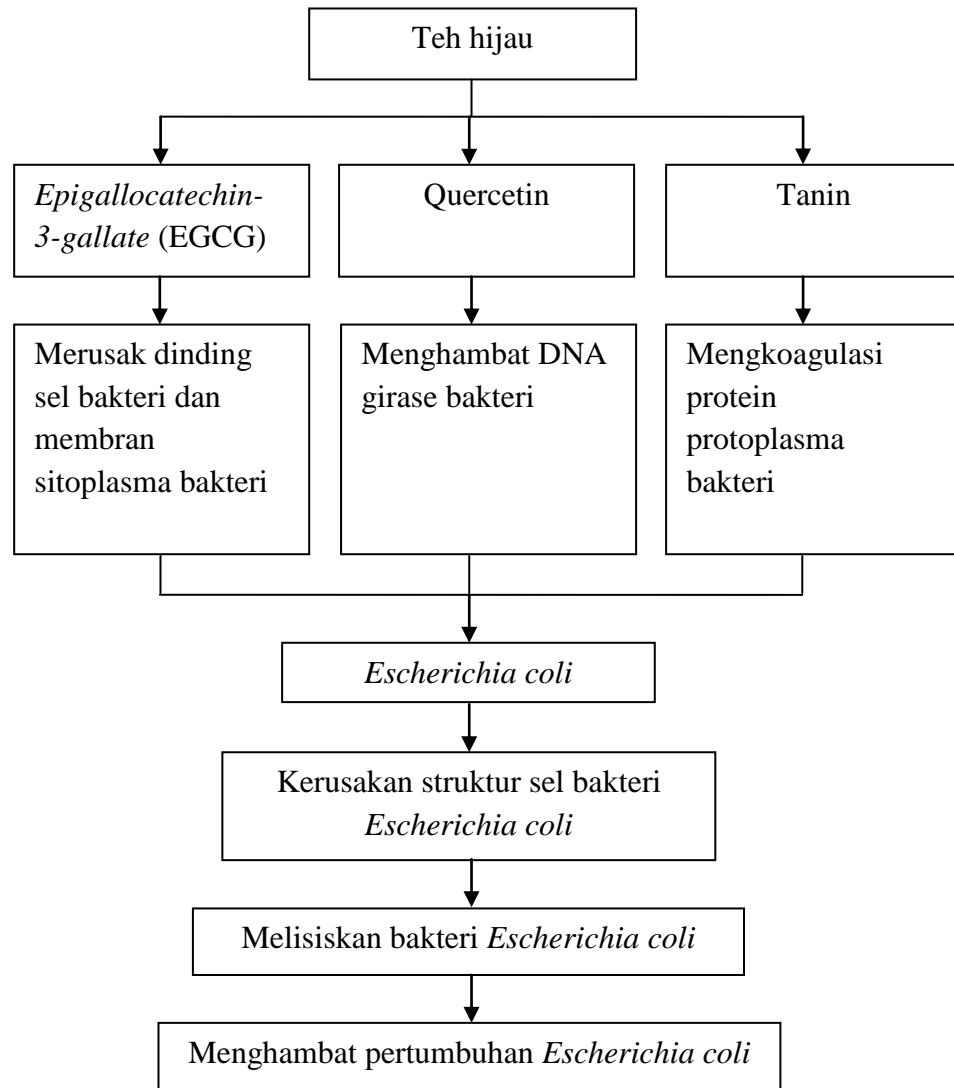
Teh hijau adalah teh yang dalam proses pembuatannya tidak mengalami fermentasi (oksidasi enzimatis) artinya yaitu dibuat dengan cara menginaktifkan enzim fenolase yang ada dalam pucuk daun teh segar, melalui pemanasan sehingga oksidasi terhadap katekin (zat antioksidan) dapat dicegah (Saraswati, 2015). Beberapa penelitian terbaru menyatakan bahwa teh hijau memiliki beberapa manfaat antara lain sebagai antikanker, antibakteri, menurunkan kolesterol, serta meningkatkan kekebalan tubuh (Murase *et al.*, 2009).

Komponen medis yang penting dari teh hijau adalah polifenol. Polifenol yang paling banyak ditemukan dalam teh hijau adalah flavanol, yaitu katekin. Katekin dalam teh hijau terdiri atas *epigallocatechin-3 gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC). Jenis polifenol lain yang ditemukan dalam teh hijau adalah flavanol yang terdiri dari quercetin, kaempferol, dan myricetin (Reygaert, 2014). Selain itu, teh hijau juga banyak mengandung senyawa kimia lain seperti alkaloid,

saponin, tanin, protein, asam amino, unsur karbohidrat seperti selulose, glukosa, pektin dan fruktosa, serta mengandung berbagai macam mineral dan vitamin (B, C dan E), lipid, pigmen berupa klorofil dan enzim-enzim yang berperan sebagai katalisator contohnya enzim amilase, protease, peroksidase (Saraswati, 2015).

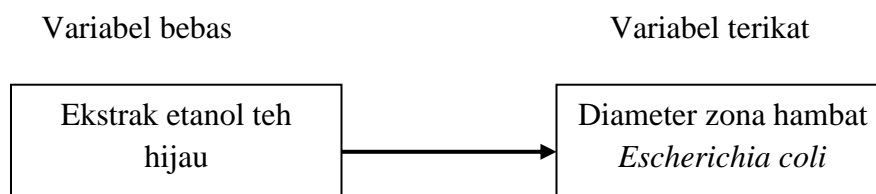
Berdasarkan beberapa penelitian, diketahui bahwa EGCG, Quercetin, dan tanin memiliki aktivitas sebagai antibiotik melalui mekanisme kerja yang berbeda-beda. EGCG bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri dan membran sitoplasmanya sehingga menyebabkan denaturasi protein (Saraswati, 2015). Quercetin bekerja dengan cara menghambat DNA girase, sehingga menghentikan proses pembentukan DNA untai ganda pada bakteri, sedangkan tanin mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengkoagulasi protein protoplasma bakteri, sehingga terjadi denaturasi pada protein tersebut dan pada akhirnya akan menyebabkan lisisnya bakteri (Kohanski *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2009; Pratiwi, 2008).

Adapun kerangka teori dari penelitian ini adalah:



Gambar 4. Kerangka Teori
(Sumber: Saraswati, 2015; Taylor *et al.*, 2009; Pratiwi, 2008).

2.7 Kerangka Konsep



2.8 Hipotesis

H0 : Ekstrak etanol teh hijau tidak dapat menghambat pertumbuhan

Escherichia coli secara *in vitro*.

H1 : Ekstrak etanol teh hijau dapat menghambat pertumbuhan

Escherichia coli secara *in vitro*.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimen laboratorium dimana rancangan penelitian ini berusaha meneliti efek dari ekstrak etanol teh hijau terhadap diameter zona hambat *Escherichia coli* secara *in vitro*. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode disk Kirby Bauer, yaitu dengan cara meletakkan disk (kertas cakram) yang sudah direndam terlebih dahulu pada ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi yang berbeda-beda selama 15 menit, kemudian diletakkan pada media agar yang sudah diinokulasi bakteri *Escherichia coli* dengan 4 kuadran (Tammi, 2016; Ismail, 2014).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan September sampai dengan November 2017.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi dan sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri *Escherichia coli* (bakteri Gram negatif) yang akan diperoleh dari UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Bandar Lampung.

3.3.1 Bahan Uji Penelitian

Penelitian ini menggunakan daun teh hijau yang sudah dibersihkan dan dikeringkan. Daun teh hijau diperoleh dari membeli daun teh kering dalam bentuk kotakan yang diperjualbelikan di salah satu swalayan yang berada Bandar Lampung. kemudian daun teh hijau akan diekstrak di Laboratorium Analisis Hasil Pangan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

3.3.2 Media Kultur

Media kultur yang digunakan pada penelitian ini yaitu lempeng Endo Agar yang digunakan untuk membiakan bakteri Gram negatif yaitu *Escherichia coli*. Setelah dilakukan kultur, digunakan media agar MHA (*Muller Hinton Agar*) sebagai media uji diameter zona hambat bakteri.

3.4 Identifikasi Variabel

Dalam penelitian ini digunakan dua variable, yaitu variabel independen dan dependen.

3.4.1 Variabel Independen

Variabel independen atau variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol teh hijau dalam berbagai tingkat konsentrasi (20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%).

3.4.2 Variabel Dependen

Variabel dependen atau variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

3.5 Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional variabel dependen dan independen

No.	Variabel	Definisi	Cara ukur	Hasil ukur	Skala
1.	Ekstrak etanol teh hijau	Suatu zat yang diperoleh dari hasil ekstraksi etanol teh hijau menjadi cairan yang mengandung <i>epigallocatechin-3-gallate</i> (EGCG), Quercetin, dan tanin dari teh hijau melalui proses mekanik dan kimiawi.	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	Ekstrak etanol teh hijau dengan kadar dan volume akhir yang diinginkan	Ordinal
2.	Daya hambat pertumbuhan <i>Escherichia coli</i>	Pertumbuhan bakteri yang terhambat setelah diberi variabel independen dengan menggunakan metode sumuran.	Menggunakan jangka sorong untuk mengukur zona hambat	Diameter zona hambat (mm)	Numerik

3.6 Besar Sampel

Dalam penelitian ini akan dilakukan pemberian berbagai kadar ekstrak etanol teh hijau yang akan diuji, yaitu pada kadar 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, serta dengan seftriakson sebagai kontrol positif, dan akuades sebagai kontrol

negatif yang akan diberikan untuk mempengaruhi pertumbuhan *Escherichia coli*. Untuk menentukan banyaknya pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini digunakan rumus Federer (Sastroasmoro, 2014):

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

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

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

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Keterangan :

n = banyaknya sampel (pengulangan)

k = banyaknya perlakuan

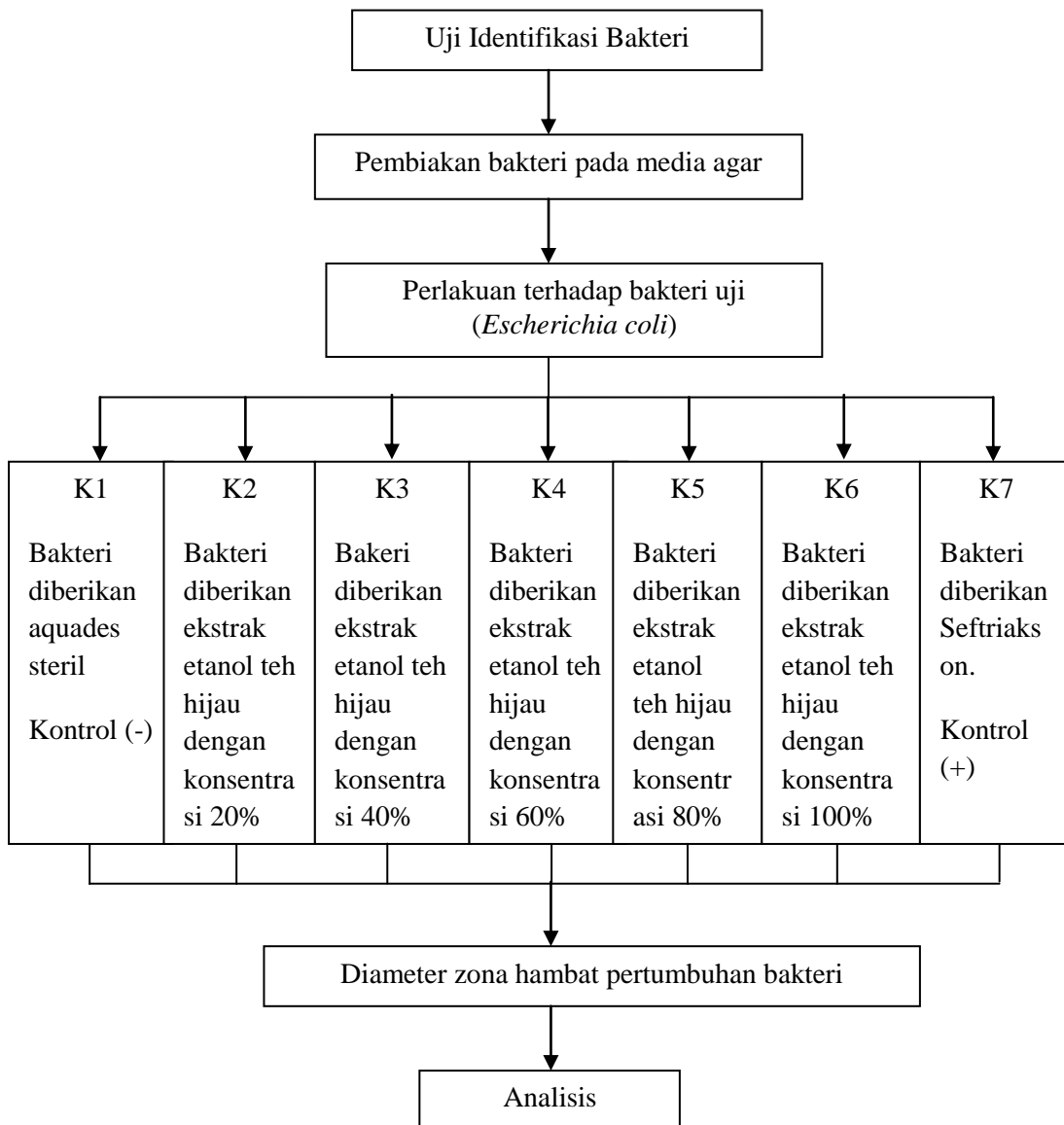
Berdasarkan hasil perhitungan dengan menggunakan rumus Federer diatas maka besar sampel yang digunakan adalah lebih dari sama dengan 3,5. Untuk menghindari terjadinya kesalahan, maka banyak sampel dibulatkan keatas menjadi 4. Besar sampel ini akan digunakan sebagai acuan dilakukannya pengulangan perlakuan pada penelitian ini. Setiap pengulangan dilakukan pada masing-masing konsentrasi dan kontrol, sehingga ada 28 kali perlakuan kepada tiap bakteri.

3.7 Kelompok Perlakuan

Tabel 3. Metode pengelompokan perlakuan berdasarkan konsentrasi teh hijau

No.	Kelompok	Perlakuan
1.	Kelompok 1 (K1)	Kelompok bakteri <i>Escherichia coli</i> yang diberikan aquades steril. Kontrol negatif.
2.	Kelompok 2 (K2)	Kelompok bakteri <i>Escherichia coli</i> yang diberikan ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 20%.
3.	Kelompok 3 (K3)	Kelompok bakteri <i>Escherichia coli</i> yang diberikan ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 40%.
4.	Kelompok 4 (K4)	Kelompok bakteri <i>Escherichia coli</i> yang diberikan ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 60%.
5.	Kelompok 5 (K5)	Kelompok bakteri <i>Escherichia coli</i> yang diberikan ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 80%.
6.	Kelompok 6 (K6)	Kelompok bakteri <i>Escherichia coli</i> yang diberikan ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 100%.
7.	Kelompok 7 (K7)	Kelompok bakteri <i>Escherichia coli</i> yang diberikan Seftriakson. Kontrol positif.

3.8 Diagram Alur Penelitian



Gambar 5. Alur penelitian uji daya hambat ekstrak etanol teh hijau terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro*

3.9 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan ini bersifat analitik laboratorik. Dalam penelitian ini, ekstrak etanol teh hijau diencerkan untuk membuat berbagai macam konsentrasi yang diinginkan di dalam tabung reaksi. Setelah terbentuk konsentrasi ekstrak yang diinginkan, disk (kertas cakram) direndam pada

ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda-beda selama 15 menit, kemudian ditiriskan sampai ekstrak tidak terlalu banyak pada disk. Selanjutnya meletakkan disk (kertas cakram) pada media agar yang sudah diinokulasi bakteri *Escherichia coli* dengan 4 kuadran. Kemudian diamati diameter zona hambat dari pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali (Tammi, 2016; Ismail, 2014).

3.9.1 Persiapan

3.9.1.1 Alat Penelitian

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain:

1. Rak dan tabung reaksi
2. Ose
3. Beker glass
4. Pipet
5. Lampu bunsen
6. Cawan petri
7. Alat pengaduk
8. Autoklaf
9. Inkubator
10. Sedotan dengan diameter 6 mm
11. Pinset
12. Disk antibiotik kosong
13. Lidi kapas steril

3.9.1.2 Bahan Penelitian

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain:

1. Ekstrak etanol teh hijau yang diperoleh dari ekstraksi daun teh hijau. Proses pengekstrakan dilakukan di Laboratorium Analisis Hasil Pangan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Bakteri *Escherichia coli*. Bakteri diperoleh dari UPTD Balai Laboratorium Klinik Bandar Lampung.
3. Media *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), Endo Agar dan MHA (*Muller Hinton Agar*).
4. Aquades steril.

3.9.2 Sterilisasi Alat

Mensterilisasi alat dan bahan penelitian, kecuali ekstrak etanol teh hijau dan suspensi kuman, agar bebas dari pengaruh mikroorganisme lain yang mungkin mempengaruhi hasil penelitian. Sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Alat-alat ditunggu sampai mencapai suhu kamar dan kering.

3.9.3 Isolasi dan Uji Identifikasi Bakteri

1. Isolasi Bakteri pada Media Agar

Bakteri yang sudah dibeli dari UPTD Balai Laboratorium Kesehatan diambil menggunakan ose bulat yang sudah disterilkan

terlebih dahulu, kemudia diinokulasikan pada media Endo Agar. Inkubasikan pada temperatur 37°C selama 24 jam. Setelah itu amati koloni *Escherichia coli* yang tumbuh pada media agar Endo Agar.

2. Pewarnaan Gram

Kaca objek dilewatkan diatas api untuk menghilangkan kotoran, kemudian kaca objek ditandai dengan spidol untuk menandai tempat meletakkan koloni. Ambil koloni yang akan di periksa dari media Endo Agar dengan ose kemudian ratakan pada kaca objek. Fiksasi preparat dengan melewati diatas api sebanyak 2–3 kali.

Untuk pewarnaan Gram yang pertama dilakukan adalah preparat ditetaskan larutan gentian violet didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan air yang mengalir, setelah itu tetaskan lugol dan didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan air yang mengalir. Langkah selanjutnya tetaskan etanol lalu dibilas dengan air yang mengalir. Tetaskan safranin dan diamkan selama 45-60 detik kemudian bilas dengan air yang mengalir. Setelah itu keringkan dengan tisu. Selanjutnya diamati dibawah mikroskop dimulai dari perbesaran 4x sampai perbesaran 1000x, dimana pada perbesaran 1000x preparat ditetesi 1 tetes minyak immersi.

3. Uji Biokimia

a. Uji *Simmon's Citrate Agar* (SCA)

Tujuannya adalah untuk mendeteksi adanya penggunaan karbon sebagai sumber energi. Caranya yaitu koloni diambil dari media dengan ose kemudian diinokulasikan ke media *Simmon's Citrate Agar* (SCA) dengan cara di gores pada media agar miring kemudian diinkubasi pada temperatur 37° C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan adanya koloni bakteri dan media berubah warna dari hijau menjadi biru. Uji Citrat pada bakteri *E. coli* adalah negatif (-).

b. Uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Media ini digunakan untuk mengetahui fermentasi gula-gula menjadi asam dengan atau tanpa gas. Prosedur pemeriksaan TSIA yaitu koloni diambil dari media kemudian diinokulasikan ke TSIA dengan cara menusuk sampai sepertiga dasar tabung kemudian diangkat dan digores secara zig zag pada media agar miring kemudian inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada bakteri *Escherichia coli* didapatkan hasil positif yang ditandai dengan terjadi perubahan warna pada dasar dan lereng tabung, adanya ruang kosong atau udara pada media, dan H₂S (-).

c. Uji SIM (Sulfur, Indol, Motility).

Uji motilitas dapat dilakukan dengan cara koloni diambil dari media kemudian diinokulasikan dengan cara menusukkan

jarum ose secara tegak lurus hingga setengah tinggi media *Sulfit Indol Motility* pada tabung reaksi. Tabung diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C selama 48 jam. Uji SIM pada *E.coli* menunjukkan hasil positif (+).

- d. Uji Gula-Gula (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa dan manitol).

Media ini digunakan untuk mengetahui fermentasi gula-gula menjadi asam dengan atau tanpa gas. Caranya biakan bakteri dari media padat diinokulasikan secara aseptik ke larutan glukosa, kemudian inkubasi 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditandai dengan tampak gelembung udara pada tabung durham (untuk glukosa).

3.9.4 Pembuatan Ekstrak Etanol Teh Hijau

Adapun cara pembuatan ekstrak etanol teh hijau antara lain:

1. Daun teh hijau dikumpulkan dan disiapkan.
2. Kemudian daun teh hijau dicuci bersih.
3. Daun teh hijau dikeringkan dan dimasukkan kedalam oven simplisia dengan suhu 50⁰C selama 1-2 hari. Daun teh hijau dinyatakan sudah kering jika mudah dipatahkan.
4. Daun teh hijau yang sudah kering dihancurkan hingga menjadi serbuk.
5. Serbuk daun teh hijau sebanyak 200 gram direndam dengan pelarut etanol dan di *shaker* selama 2 hari serta ditutup dengan

menggunakan aluminium foil untuk menjaga agar tidak terjadi penguapan dan hasil ekstrak yang diperoleh akan lebih baik. Proses ini disebut sebagai tahap maserasi.

6. Rendaman serbuk daun teh hijau diperas dengan menggunakan kertas saring.
7. Hasil saringan daun teh hijau diekstrak menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 40°C selama 4 jam yang berguna untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak daun teh hijau agar diperoleh ekstrak etanol yang pekat.
8. Ekstrak etanol teh hijau yang pekat tersebut kemudian diencerkan dengan akuades.
9. Pengenceran dilakukan dengan perbandingan ekstrak etanol teh hijau dan akuades yang dapat dihitung menggunakan persamaan $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$, sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak etanol teh hijau sesuai yang diinginkan.
10. Konsentrasi ekstrak etanol teh hijau yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

3.9.5 Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan *Mc Farland*

Larutan baku *Mc Farland* 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 *Mc Farland* 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.

3.9.6 Teknik Pembuatan Suspensi Bakteri

1. Bakteri strain murni *Escherichia coli* dibuat suspensi dengan menambahkan larutan *Nutrient Broth* (NB) di dalam tabung reaksi, sampai didapatkan kekeruhan yang disesuaikan dengan standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5 untuk mendapatkan bakteri sebanyak $1,5 \times 10^8$ cfu/mL.
2. Kekeruhan dilihat dengan membandingkan suspensi bakteri dengan standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5. Jika kurang keruh, suspensi ditambahkan koloni sedangkan jika lebih keruh ditambahkan *Nutrient Broth* (NB).

3.9.7 Pembuatan Media Agar MHA (*Muller Hinton Agar*) untuk Metode Sumuran Kirby Bauer

Pembuatan medium agar *Mueller Hinton* dilakukan dengan memasukkan 7,6 gram serbuk MHA ke dalam 200 ml akuades pada tabung Erlenmeyer dan diaduk hingga larut. Pembuatan dilanjutkan dengan pemanasan di atas api agar larutan homogen, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit dengan tekanan udara 1 atm suhu 121°C. Media MHA yang sudah steril, didiamkan sampai kisaran suhu 50-60°C, kemudian secara aseptis dicampurkan kultur bakteri uji (*Escherichia coli*) dengan perbandingan 1:5 ml (bakteri :

media). Media yang sudah bercampur bakteri uji dituang kedalam kedalam cawan petri steril masing-masing 20 ml dan dibiarkan memadat. Media padat yang bercampur bakteri uji, dibuat sumuran dengan menggunakan sedotan steril dengan diameter 6 mm.

3.9.8 Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro* dengan Metode Sumuran Kirby Bauer

1. Ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dimasukkan pada sumuran yang telah dibuat dengan diameter 6 mm pada media agar dengan jarak \pm 15 mm sebanyak masing-masing 50 μ l (Ainurrochmah *et al.*, 2013).
2. Seftriakson digunakan sebagai kontrol positif untuk bakteri *Escherichia coli* sebanyak 50 μ l.
3. Akuades steril digunakan sebagai kontrol negatif dan dimasukan ke dalam sumuran sebanyak 50 μ l.
4. Media agar lalu diinkubasi pada suhu kamar 37⁰C selama 24 jam.
5. Zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran diukur dengan menggunakan penggaris.
6. Prosedur diatas dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

3.9.9 Pembuatan Media Agar MHA (*Muller Hinton Agar*) untuk Metode Disk Kirby Bauer

Pembuatan medium agar *Mueller Hinton* dilakukan dengan memasukkan 7,6 gram serbuk MHA ke dalam 200 ml akuades pada

tabung Erlenmeyer dan diaduk hingga larut. Pembuatan dilanjutkan dengan pemanasan di atas api agar larutan homogen, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit dengan tekanan udara 1 atm suhu 121°C. Media MHA yang sudah steril, dituang ke dalam cawan petri steril masing-masing 20 ml dan dibiarkan memadat. Kemudian menggunakan lidi kapas steril, ambil suspensi bakteri yang sudah distandarkan kekeruhannya dengan standar kekeruhan *Mc Farland* 0,5. Lalu oleskan/swab secara merata pada MHA yang sudah padat. Tunggu sampai 10 menit.

3.9.10 Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Teh Hijau terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro* dengan Metode Disk Kirby Bauer

1. Kertas cakram direndam dalam ekstrak etanol teh hijau pada masing-masing konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, pada Seftrikson sebagai kontrol (+) dan akuades sebagai kontrol negatif. Kertas cakram direndam selama \pm 15 menit.
2. Kemudian dengan menggunakan pinset steril, letakkan kertas cakram yang sudah direndam pada MHA dengan 4 kuadran. Media agar lalu diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 24 jam.
3. Diukur zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran dengan menggunakan penggaris atau jangka sorong.
4. Prosedur diatas dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

3.10 Pengolahan dan Analisis Data

3.10.1 Pengolahan Data

Pada penelitian ini, data yang diperoleh dari hasil penelitian diubah ke dalam bentuk tabel, kemudian data diolah menggunakan program IBM *SPSS Statistic 23 for Windows*.

3.10.2 Analisis Data

3.10.2.1 Analisis Univariat

Analisis univariat bertujuan menjelaskan atau mendeskripsikan karakteristik tiap variabel penelitian. Untuk data numerik digunakan nilai mean atau rata-rata, median, dan standar deviasi. Pada umumnya dalam analisis ini hanya menghasilkan distribusi/persebaran dari data yang diperoleh.

3.10.2.2 Analisis Bivariat

Besar sampel penelitian ini < 50 , maka digunakan uji *Shapiro-wilk* untuk menguji normalitas data. Jika diperoleh nilai $p > 0,05$ berarti menunjukkan bahwa data berdistribusi normal, namun jika nilai $p < 0,05$ berarti menunjukkan bahwa data berdistribusi normal tidak. Analisis ini digunakan untuk menganalisis variabel independen dan dependen,

yaitu untuk mengetahui ada tidaknya zona hambat pemberian ekstrak etanol teh hijau terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Interpretasi uji statistik ini, yaitu:

1. Bila $p < 0,05$ maka hasil bermakna/signifikan, artinya terdapat hubungan bermakna antara variabel independen dan dependen, atau hipotesis penelitian diterima.
2. Bila $p > 0,05$ maka hal ini berarti dua sampel yang diteliti tidak mendukung adanya perbedaan yang bermakna dan tidak ada pengaruh variabel independen terhadap dependen, atau hipotesis penelitian ditolak.
3. Namun jika data penelitian tidak berdistribusi normal, untuk *One-way* Anova digunakan uji alternatif *Kruskal-Wallis* dilanjutkan dengan *Mann-Whitney*.

3.11 Dummy Table

Tabel 4. Perkiraan zona hambat ekstrak etanol teh hijau terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *in vitro*.

No	Kelompok	Konsentrasi Ekstrak Etanol Teh Hijau (%)	Zona hambat pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> (mm)
1.	K1	Kontrol Positif	31
2.	K2	Konsentrasi 20%	13
3.	K3	Konsentrasi 40%	18
4.	K4	Konsentrasi 60%	22
5.	K5	Konsentrasi 80%	26
6.	K6	Konsentrasi 100%	29
7.	K7	Kontrol Negatif	0

3.12 Ethical Clearance

Penelitian ini sudah diajukan dan disetujui oleh bagian komisi *Ethical clearance* dari Fakultas Kedokteran Universitas Lampung dengan nomor 3651/UN26.8/DL/2017.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol teh hijau dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.
2. Ekstrak etanol teh hijau dengan konsentrasi 20% memiliki daya hambat paling besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro* dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak etanol teh hijau lainnya.

5.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya antara

1. Bagi peneliti selanjutnya, diharapkan dapat melakukan per mengenai manfaat teh hijau bagi kesehatan namun tidak yang melalui pengolahan ekstraksi.
2. Peneliti selanjutnya diharapkan dapat melanjutkan penelitian ini dengan menggunakan jenis bakteri yang berbeda.

3. Peneliti selanjutnya diharapkan dapat melanjutkan penelitian ini dengan menggunakan konsentrasi ekstrak etanol teh hijau lebih kecil dari 20% agar dapat diketahui apakah dengan konsentrasi yang lebih kecil, ekstrak etanol teh hijau lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* secara *in vitro*.
4. Peneliti selanjutnya diharapkan dapat melanjutkan penelitian ini dengan menggunakan jenis pelarut yang berbeda seperti pelarut semipolar atau pelarut nonpolar.

DAFTAR PUSTAKA

- Adriani F. 2010. Pemberian ekstrak teh hijau menurunkan berat badan, lingkar perut, dan presentase lemak tubuh pada wanita kelebihan berat badan yang melakukan latihan fisik dengan pola makan biasa [skripsi]. Denpasar: Universitas Udayana.
- Ainurrochmah A, Ratnasari E, Lisdiana L. 2013. Efektivitas ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* dengan metode sumuran. *Jurnal Lentera Bio*. 2(3):233–7.
- Anindita R, Tri RS, Nanik HS. 2012. Potensi teh hijau (*Camelia sinensis* L.) dalam perbaikan fungsi hepar pada mencit yang diinduksi Monosodium Glutamat (MSG). 2(20):15-23.
- Bobone, Emaliah, Herdi Y, Ovi YM, Siti RP. 2013. Antibiotik. Pangkal Pinang: Poltekkes Kemenkes RI.
- Brooks GF, Butel, JS, Morse SA. 2008. Mikrobiologi kedokteran terjemahan. Edisi Ke-23. Jakarta: EGC.
- Brooks GF, Morse SA, Butel JS, Carroll KC, Mietzner TA. 2013. Mikrobiologi kedokteran. Edisi Ke-25. Jakarta: EGC.
- Clifford MN, Van der Hooft JJ, Crozier, A. 2013. Human studies on the absorption, distribution, metabolism, and excretion of tea polyphenols. *Am. J. Clin. Nutr.* 98:1619S–30S.
- Dewi FK. 2010. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citifolia* L.) terhadap bakteri pembusuk daging segar [skripsi]. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Sebelas Maret.
- Erwiyani AR. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol buah ceremeh (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dan bioautografinya [skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Febrika L. 2012. Aktivitas antimikroba pada ekstrak jinta hitam (*Nigella sativa*) terhadap pertumbuhan bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*,

- Streptococcus sp.) dan bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) secara *in vitro* [skripsi]. Bandar Lampung: Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
- Handajani NS, Purwoko T. 2008. Aktivitas ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus* sp. penghasil aflatoxin dan *Fusarium moniliforme*. *Biodiversitas*. 9(3):161-4.
- Hendrayati TI. 2012. Perubahan morfologi *Escherichia coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao*) secara *in vitro* [skripsi]. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Hosseinzadeh H, Bibi S, Sahar S, Bahman. 2016. Effect of catechins, green tea extract and methylxanthines in combination with gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pharmacopuncture*. 19(4):312-8.
- Indang N, Guli MM, Alwi M. 2013. Uji resistensi dan sensitivitas bakteri *Salmonella thypi* pada orang yang sudah pernah menderita demam tifoid terhadap antibiotik. *Jurnal Biocelebes*. 7(1): 27-34.
- International Tea Committee (ITC). 2015. Annual bulletin of statistics 2015. International Tea Committee. USA.
- Ismail KM. 2014. Uji daya hambat bakteri *Aeromonas hydrophila* setelah pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*Annona muricata* L) secara *in vitro* [artikel skripsi]. Malang: Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.
- Jawetz M, Melnick R, Adelberg. 2008. Mikrobiologi kedokteran. Jakarta: EGC. Hlm.199-200.
- Jeon J, Joo HK, Chang KL, Chil HO, Hae JS. 2014. The antimicrobial activity of (–)-Epigallocatechin-3-Gallate and green tea extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolated from skin wounds. *Ann Dermatol*. 26(5):564-9.
- Jigisha A, Nishant R, Navin K, Pankaj G. 2012. Green tea: A magical herb with miraculous outcomes. *Int. Res. J. Pharm*. 3:139-48.
- Karlina CY, M. Ibrahim, G. Trimulyono. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak herba krokot (*Potulaca oleracea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Lentera Bio*. 2(1):87-93.
- Kassem M. 2008. Society for general microbiology. Edinburgh.1
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2011. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2406/Menkes/Per/XII/2011 tentang Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik. Jakarta: Kemenkes RI.

- Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G, Collins JJ. 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. 135:679–90.
- Kuntari C. 2007. Uji aktivitas penangkapan radikal hidroksil oleh ekstrak etanol teh hijau dan teh hitam dengan metode deoksiribosa [skripsi]. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Kusuma SAF. 2010. *Escherichia coli*. Bandung: Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran.
- Kress H. 2011. Practical herbs. [Online] [diakses pada 05 Oktober 2017]. Tersedia dalam: <http://henriettesherbal.com/pictures/p03/pages/camellia-sinensis-1.htm>.
- Mahmood T, Akhtar N, Khan BA. 2010. The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis* (tea). 4(19):2028–33.
- Marie P, Onge. 2005. Dietary fats, teas, dairy, and nuts: Potential functional foods for weight control. *Journal American Society for Clinical Nutrition*. 81:7-15.
- Murase T, Misawa K, Haramizu S, Hase T. 2009. Catechin-induced activation of the LKB1/AMP-activated protein kinase pathway. *Biological Science Laboratories. Journal Biochem Pharmacol*. 78(1):78-84.
- Nygren BL, Schilling KA, Blanton EM, Silk BJ, Cole DJ, Mintz ED. 2012. Foodborne outbreaks of shigellosis in the USA 1998-2008. *Epidemiology and Infection*. 141(2):233–241.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2007. *Dasar - dasar mikrobiologi I*. Jakarta: UI-Press.
- Purwani EH, Setyo WN, Rauf R. 2009. Respon hambatan bakteri Gram positif dan negatif pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diawetkan dengan ekstrak jahe (*Zingiber officinale*). *Jurnal Kesehatan*. 2(1):61–70.
- Putra AMP, Rustifah, Muhammad A. 2015. Uji aktivitas antimikroba infusum teh hijau dan teh hitam (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) terhadap *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 1(1):68-74.
- Putri ND. 2015. Identifikasi bakteri *Escherichia coli* pada es batu yang dijual warung nasi di kelurahan Pisangan tahun 2015 [skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Pratiwi ST. 2008. *Mikrobiologi farmasi*. Jakarta: Penerbit Airlangga. Hlm.22-42,154-67 dan 188-89
- Prayoga E. 2013. Perbandingan efek ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dengan metode difusi disk dan sumuran terhadap pertumbuhan bakteri

- Staphylococcus aureus [skripsi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Redjeki S. 2014. Uji aktivitas antimikroba infusum teh hijau dan teh hitam (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) terhadap *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 11(1):98-107.
- Reygaert W, Jusufi I. 2013. Green tea as an effective antimicrobial for urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 4(162):1-4.
- Reygaert WC. 2014. The antimicrobial possibilities of green tea (focused review). 5(434)
- Rundengan CH, Fatmawali, Herny S. 2017. Uji daya hambat ekstrak etanol biji pinang yaki (*Areca vestiaria*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 6(1):37-46.
- Saraswati A. 2015. Efektivitas ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan NaOCL 2,5% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* sebagai alternatif larutan irigasi saluran akar [skripsi]. Makassar: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin.
- Sastroasmoro S. 2014. Metode penelitian klinis dasar. Jakarta: PT. Bina Rupa Aksara.
- Setiabudy R. 2007c. Pengantar antimikroba. Dalam: Gunawan SG, Setiabudy R., Nefrialdi, Elysaabeth, penyunting. *Farmakologi dan terapi*. Edisi Ke-5. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. Hlm. 585 – 598.
- Setiabudy R. 2012. *Farmakologi dan terapi*. Edisi Ke-5. Jakarta: Badan Penerbit FKUI. Hlm. 673,714,720
- Siswoyo R. 2009. *Kimia organik*. Jakarta: Erlangga.
- Soleha TU. 2015. Susceptibility test of antimicroba. *Juke Unila*. 5(9):119-23.
- Stalmach A, Troufflard S, Serafini M, Crozier A. 2009. Absorption, metabolism and excretion of Choladi green tea flavan-3-ols by humans. *Mol. Nutr. Food Res*. 53:S44–53.
- Standar Nasional Indonesia. 2009. Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- Suardana dan Swarcita. 2009. *Higiene makanan*. Denpasar: Udayana University Press.
- Sumarno. 2000. *Teknik dasar pemeliharaan mikroba*. Jakarta: Intan Prawira

- Tammi A. 2016. Perbandingan daya hambat ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* [wight.] walp) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro* [skripsi]. Bandar I Fakultas Kedokteran Universitas Lampung.
- Taylor PW, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. 2009. Antimicrobial activity of green tea catechins. *Food Science and Technology Bulletin*. 2:71–81.
- Tuminah S. 2007. Teh sebagai salah satu antioksidan. Jakarta: Depkes RI.
- Waluyo L. 2012. Mikrobiologi umum. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang.
- Widyasanti A, Siti H, Dadan R. 2015. Aktivitas antibakteri ekstrak teh putih terhadap bakteri Gram positif dan negatif. *Jurnal Penelitian Teh dan Kina*. 18(1):55-60.
- Yuwono LF. 2009. Daya antibakteri ekstrak daun teh (*Camellia sinensis*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus* sp. pada plak gigi [skripsi]. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.