



**PERUBAHAN MORFOLOGI *Escherichia coli* AKIBAT PAPARAN
EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao*)
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

oleh

**Teksis Irena Hendrayati
NIM 092010101025**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2012**



**PERUBAHAN MORFOLOGI *Escherichia coli* AKIBAT PAPARAN
EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao*)
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

oleh

**Teksis Irena Hendrayati
NIM 092010101025**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dengan hidayah yang diberikan melalui ciptaanNya, yang pada akhirnya saya bisa merasakan kebesaranNya melalui akal dan hati;
2. Ayahanda Muljono, SP,MM., Ibunda Sugiyarti, SP., yang senantiasa memberikan doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang tiada henti, serta pengorbanan yang telah dilakukan untukku setiap waktu. Senyum dan kebahagiaan mereka adalah harapan terbesarku;
3. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes dan Dr. Ir. Misnawi yang telah meluangkan waktunya untuk mengantarkan saya pada gerbang yang sesungguhnya;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO

Sesuatu mungkin mendatangi mereka yang mau menunggu,
namun hanya didapatkan oleh mereka yang bersemangat mengejarnya. *)

*) Kata-kata bijak Abraham Lincoln, Instsink Publishing, 2005

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Teksis Irena Hendrayati

NIM : 092010101025

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Perubahan Morfologi *Escherichia Coli* akibat Paparan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) secara *In vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Oktober 2012

Yang menyatakan,

Teksis Irena Hendrayati
NIM 092010101025

SKRIPSI

**PERUBAHAN MORFOLOGI *Escherichia coli* AKIBAT PAPANAN
EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao*)
SECARA *IN VITRO***

Oleh

Teksis Irena Hendrayati
NIM 092010101025

Pembimbing:

Dosen Pembimbing I : dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes

Dosen Pembimbing II : Dr. Ir. Misnawi

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Perubahan Morfologi *Escherichia Coli* Akibat Paparan Ekstrak Etanoi Biji Kakao (*Theobroma cacao*) secara *In vitro*” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Senin, 29 Oktober 2012

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I,



dr. Enny Suswanti, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

Penguji II,



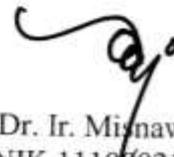
dr. Sugiyanta, M. Kes
NIP 19790287 200501 1 001

Penguji III,



dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes
NIP 19720318 200312 2 001

Penguji IV,



Dr. Ir. Misnawi
NIK 111060217

Mengesahkan
Dekan,



dr. Enny Suswanti, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Perubahan Morfologi *Escherichia coli* Akibat Paparan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) Secara *In vitro*; Teksis Irena Hendrayati, 092010101025; 2012: 51 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Kasus infeksi masih menjadi salah satu masalah kesehatan dunia, terutama di negara-negara berkembang. Infeksi dapat disebabkan oleh organisme patogen, baik virus, parasit, jamur, maupun bakteri. Salah satu bakteri penyebab infeksi yang sering ditemukan adalah *Escherichia coli* (*E. coli*). *E. coli* merupakan penyebab 80% infeksi saluran kemih di negara maju, 50% penyebab pneumonia dengan umur rata-rata penderita 53 tahun, penyebab 80% meningitis pada neonatus dan juga dapat menyebabkan diare. Namun, dalam beberapa tahun terakhir, *E. coli* telah resisten terhadap antibiotik yang telah umum digunakan seperti golongan penicillin (ampisilin, penicillin, amoksisilin), golongan sefalosporin (sefaleksin), golongan aminoglikosida (kanamisin). Adanya resistensi ini, maka perlu dilakukan penelitian untuk mencari substansi antibakteri baru dari alam, salah satunya adalah biji kakao (*Theobroma cacao*). Biji kakao kaya akan senyawa polifenol. Polifenol biji kakao yang berpotensi sebagai antibakteri adalah katekin, tanin, dan flavonoid. Penelitian sebelumnya telah terbukti biji kakao dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi hambat minimal 15,6 mg/ml.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao secara *in vitro*. Metode uji yang digunakan adalah *Scanning Electron Mikroskop* (SEM) dengan media *Muller Hinton Broth* (MHB). Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental semu (*Quasi Experimental Design*). Sampel yang digunakan adalah koloni bakteri *E. coli* yang disesuaikan dengan standar 0,5 *Mc Farland*. Konsentrasi larutan uji yang digunakan adalah 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml, dan 7,8

mg/ml. Kontrol positif menggunakan suspensi *ceftriaxon* dan kontrol negatif menggunakan larutan aquades steril. Data yang diperoleh berupa gambar *E. coli* pada foto positif dan foto negatif dan diukur menggunakan skala pengukuran SEM. Data kemudian dianalisis secara diskriptif.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao secara *in vitro*. Perubahan tersebut ditunjukkan dengan adanya pertambahan panjang (elongasi) dan terjadi penurunan kesan jumlah. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak polifenol biji kakao maka perubahan yang terjadi semakin nyata. Perubahan tersebut terjadi karena adanya kandungan flavonoid, katekin dan tanin yang terdapat pada biji kakao.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat ALLAH SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Perubahan Morfologi *Escherichia coli* Akibat Paparan Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) secara *in vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
2. dr. Diana Chusna Mufida, M.Kes dan Dr. Ir. Misnawi selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam penulisan tugas akhir ini;
3. dr. Enny Suswanti, M.Kes dan dr. Sugiyanta, M.Kes sebagai dosen penguji yang banyak memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Ayahanda Muljono, SP,MM., Ibunda Sugiyarti, SP., dan Adik tercinta Rizal Anshori Jati Hidayat yang senantiasa memberikan doa, dukungan, bimbingan, kasih sayang tiada henti, serta pengorbanan yang telah dilakukan untukku setiap waktu. Senyum dan kebahagiaan mereka adalah harapan terbesarku;
5. Nenek dan kakekku tercinta yang selalu memberikan doa dan dukungan;
6. Bhaktiarudin yang selalu senantiasa memberikan doa, dukungan dan kekuatan untuk terus maju;
7. Alvin Isnaini dan Dafista diyantika yang selalu memberikan dukungan dan bantuannya dalam penyusunan skripsi ini;

8. guru-guruku tercinta, yang telah memberikan ilmu dan mendidikku dengan susah dan penuh kesabaran untuk menjadikanku manusia yang berilmu dan bertakwa;
9. temen-temenku Imas Ayu Arjianti Putri, Anre Hernadia Inas, I Wayan Putra Prayoga, Alfina Hadid Firdiansyah, Selma Balafif, Rafli yang selalu memberi dukungan dan bantuannya;
10. saudara-saudaraku Desyana Perwitahtati, Nurul Istiqfaroh, Andin, Wenti, Prima, Risma, Dwi Hastuti, Firdia, Rosyda Umami, Rizki, Eksi, Tia, Okta, Luki yang selalu memberikan doa dan kasih sayang.
11. teman-temanku Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Jember Angkatan 2008 yang selalu memberi dukungan dan bantuannya;
12. teknisi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Univeritas Jember, Mbak Lilis dan Tim dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Mbak Fitrah, Mbak Ari, Mas Panji, Mas Sohib dan Pak Abu terima kasih atas bantuan dan kerjasama, dukungan serta masukan selama penelitian skripsi ini;
13. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Oktober 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUNG	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.1 Taxonomi.....	4
2.1.2 Morfologi.....	4
2.1.3 Struktur Antigenik.....	5
2.1.4 Klasifikasi.....	6
2.1.5 Penyakit yang disebabkan <i>E. coli</i>	7
2.2 <i>Tanaman Kakao (Theobroma cacao)</i>	8
2.2.1 Sejarah.....	9

2.2.2	Biji Kakao.....	10
2.2.3	Kandungan Biji Kakao	10
2.2.4	Polifenol dan Flavonoid Kakao	11
2.3	Antimikroba.....	14
2.4	Antibiotik Untuk <i>E. coli</i>	16
2.5	Ceftriaxon	16
2.6	Ekstraksi	17
2.6.1	Definisi	17
2.6.3	Metode Pembuatan Ekstrak.....	18
2.8	SEM (Scanning Electron Mikroskop)	19
2.9	Kerangka Konseptual Penelitian	22
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	23
3.1	Jenis Penelitian	23
3.2	Rancangan Penelitian	23
3.3	Uji Perubahan Morfologi Bakteri	24
3.4	Sampel Penelitian	24
3.5	Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.5.1	Tempat Penelitian	24
3.5.2	Waktu Penelitian.....	24
3.6	Variabel penelitian	24
3.6.1	Variabel Bebas	24
3.6.2	Variabel Terikat	24
3.6.3	Variabel Terkendali.....	25
3.7	Definisi Operasional	25
3.8	Alat dan Bahan	25
3.8.1	Alat.....	25
3.8.2	Bahan.....	26
3.9	Prosedur Penelitian	26
3.9.1	Persiapan Alat.....	26
3.9.2	Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Kakao	26
3.9.3	Pembuatan Larutan 0,5 Mc Farlan.....	26

3.9.4	Pembuatan Media.....	27
3.9.5	Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Biji kakao ..	27
3.9.6	Pembuatan Suspensi <i>E. coli</i>	27
3.9.7	Pembuatan Suspensi Ceftriaxon	28
3.9.8	Tahap Perlakuan.....	28
3.10	Analisis Data	29
3.11	Alur Penelitian	30
3.11.1	Pengenceran Ekstrak	30
3.11.2	Alur Penelitian	31
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1	Hasil Penelitian	32
4.1.1	Total Polifenol	32
4.1.2	Perubahan Morfologi <i>E. coli</i> Akibat Ekstrak Etanol Biji Kakao dengan SEM	33
4.2	Analisis Data	36
4.3	Pembahasan	37
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1	Kesimpulan	41
5.2	Saran	41
	DAFTAR PUSTAKA	42
	LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1	Taxonomi <i>Escherichia coli</i> 4
2.2	Klasifikasi ilmiah kakao 8
2.3	Komposisi kimia biji kakao 11
2.4	Komposisi polifenol dalam biji kakao Forastero 12
4.1	Hasil pengukuran perubahan morfologi <i>Escherichia coli</i> berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji kakao 36

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi <i>Escherichia coli</i> dilihat dengan <i>scanning electron microscope</i>	5
2.2 Skema kerangka konseptual penelitian	22
3.1 Skema rancangan penelitian uji aktivitas antibakteri	23
3.2 Skema pengenceran ekstrak	30
3.3 Skema alur penelitian	31
4.1 Perubahan morfologi <i>Escherichia coli</i> akibat paparan aquades (kontrol negatif) pada perbesaran 3500 kali	33
4.2 Perubahan morfologi <i>Escherichia coli</i> akibat paparan <i>ceftriaxon</i> (kontrol positif) pada perbesaran 3500 kali	34
4.3 Perubahan morfologi <i>Escherichia coli</i> akibat paparan ekstrak etano biji kakao konsentrasi 7,8 mg/ml pada perbesaran 3500 kali.....	34
4.4 Perubahan morfologi <i>Escherichia coli</i> akibat paparan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml pada perbesaran 3500 kali .	35
4.5 Perubahan morfologi <i>Escherichia coli</i> akibat paparan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml pada perbesaran 3500 kali.....	35
4.6 Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol biji kakao dengan reubahan morfologi <i>Escherichia coli</i>	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Mengukur Skala Pada Foto SEM.....	46
Lampiran B. Gambar Preparat Siap dilihat pada Mikroskop Elektron.....	48
Lampiran C. Gambar Alat <i>Scanning Electron Mikroskop</i>	49
Lampiran D. Calibration Curve	50
Lampiran E. Consentration Result.....	51

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu bakteri patogen yang ditemukan pada manusia adalah *Escherichia coli*. *E. coli* merupakan bakteri yang termasuk dalam keluarga *Enterobacteriaceae*. Seperti kuman *Enterobacteriaceae* yang lain kuman ini berbentuk batang, tidak berspora, bersifat negatif terhadap pewarnaan Gram, serta dapat bergerak dengan menggunakan peritricus flagella. Ukuran panjang 1-4 mikron, lebar 0,4-0,7 mikron, susunan kuman umumnya menyebar. *E. coli* merupakan penyebab 80% infeksi saluran kemih di negara maju, 50% penyebab pneumonia dengan umur rata-rata penderita 53 tahun, penyebab 80% meningitis pada neonatus. *E. coli* juga merupakan salah satu penyebab diare pada manusia. Strain *E. coli* yang menyebabkan diare pada manusia, yaitu *EHEC* (*Enterohemorrhagic E. coli*), *EPEC* (*Enteropathogenic E. coli*), *ETEC* (*Enterotoxigenic E. coli*), *EIEC* (*Enteroinvasive E. coli*), *EagEC* (*Enteroadgregative E. coli*) (Mufidaet *al.*, 2006).

Sampai saat ini penyakit diare masih menjadi masalah kesehatan dunia terutama di negara berkembang. Besarnya masalah tersebut dilihat dari angka kesakitan dan kematian akibat diare. Data dari profil kesehatan Indonesia tahun 2008 menunjukkan kejadian luar biasa (KLB) diare terjadi di 15 provinsi dengan *Case Fatality Rate* (CFR) akibat diare sebesar 2,48% dengan 209 orang meninggal dari 8.443 kasus. Angka ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan tahun 2007, yaitu CFR sebesar 1,89% dengan 69 orang meninggal dari 3.659 kasus KLB diare yang terjadi hanya pada 8 provinsi (Depkes RI, 2009).

Pengobatan infeksi yang paling umum dilakukan adalah dengan terapi antibiotik. Begitu pula dengan pengobatan diare yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Antibiotik tersebut dalam jumlah yang sedikitpun masih mempunyai daya hambat terhadap kegiatan mikroorganisme (Iman, 2009). Timbulnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik pada penyakit infeksi merupakan masalah

penting. Pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan bakteri yang resisten terhadap antibiotik memerlukan produk baru yang memiliki potensi tinggi. Penelitian zat yang berkasiat sebagai antibakteri perlu dilakukan untuk menemukan produk antibiotik baru yang berpotensi untuk menghambat atau membunuh bakteri yang resisten antibiotik dengan harga yang terjangkau. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh adalah memanfaatkan zat aktif pembunuh bakteri yang terkandung dalam tanaman obat (Iman, 2009).

Sejumlah tanaman yang diketahui kaya akan senyawa-senyawa bioaktif, terutama polifenol, yang mempunyai khasiat sebagai antioksidan dan antibakteri. Senyawa antibakteri sangat diperlukan akhir-akhir ini dikarenakan makin banyaknya bakteri patogen yang telah resisten dengan antibakteri yang ada. Salah satu tanaman di Indonesia yang berpotensi sebagai sumber antibakteri alami adalah tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*). Biji kakao dikenal dengan produk olahannya yaitu coklat, dan ternyata biji kakao ini memiliki kandungan polifenol total yang lebih tinggi dibandingkan dengan teh, baik teh hitam maupun teh hijau.

Polifenol kakao bersifat antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen dan bakteri kariogenik (Osawa *et al.*, 2000; Bouchers, 2002; Lamuela-Raventos, 2005). Senyawa polifenol dalam biji kakao yaitu flavonoid, katekin, prosianidin, antosianidin dan tanin kompleks. Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi dan mencegah kanker (Stauth, 2007). Selain flavonoid katekin adalah senyawa polifenol alami, yang merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun tanin (Hastuti, 2010). Katekin bersifat sebagai antimikroba, memperkuat pembuluh darah melancarkan air seni dan menghambat pertumbuhan kanker (Wahluyo dalam Setiadevi., 2010). Adanya kandungan polifenol sebagai antibakteri pada biji kakao sangat potensial untuk dimanfaatkan sebagai terapi terhadap infeksi bakteri termasuk *E. coli*.

Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa polifenol kakao telah terbukti memiliki daya antibakteri. Salah satunya terhadap bakteri *E. coli*, akan tetapi mekanisme kematian bakteri oleh polifenol kakao belum banyak diketahui. Pada penelitian sebelumnya telah ditemukan KHM pada konsentrasi 15,62 mg/ml (Nila, 2012). Pada penelitian ini peneliti ingin menganalisis bagaimana mekanisme

kematian bakteri yang salah satunya diamati perubahan morfologi dari *E. coli* terhadap pemberian antibiotik yang berasal dari ekstrak etanol biji kakao dengan konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml dan 7,8 mg/ml.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan bagaimana perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml dan 7,8 mg/ml?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian di atas, maka tujuan peneliti adalah untuk mengetahui perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml dan 7,8 mg/ml

1.4 Manfaat Penelitian

- a. Memperluas wawasan mahasiswa mengenai zat-zat antibakteri yang ada di alam dan mengetahui perubahan morfologi bakteri.
- b. Memberikan sumbangan pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran terutama di bidang mikrobiologi.
- c. Dapat dijadikan bahan acuan atau tinjauan pustaka untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertama kali diidentifikasi didalam flora usus dari bayi oleh seorang dokter anak dari German yang bernama Theodor Escherich (1885) yang kemudian menamai bakteri ini *Bacterium coli commune*. Nama *Escherichia* diberikan pada tahun 1920 sebagai penghargaan terhadap Theodor Escherich (Berg, 2004).

2.1.1 Taxonomi

Tabel 2.1 Taxonomi *E. coli*

Klasifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i>	
Domain	<i>Bacteria</i>
Kingdom	<i>Monera</i>
Divisi	<i>Eubacteria</i>
Kelas	<i>Proteobacteria</i>
Ordo	<i>Enterobacteriales</i>
Famili	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	<i>Escherichia</i>
Spesies	<i>Escherichia coli</i>

Sumber: Lerner *et al.* (2003); Morder (2008); NEW (2010)

2.1.2 Morfologi

E. coli merupakan bakteri anaerobik fakultatif (Campbell *et al.*, 2002-1) berbentuk batang dan berukuran sangat kecil dengan panjang sekitar 2,2 μm dan diameter 0,8 μm . Bakteri ini tidak memiliki nukleus, organel terbungkus membran maupun sitoskeleton. Meskipun demikian, *E. coli* memiliki organel eksternal yakni vili yang merupakan filamen tipis untuk menangkap substrat spesifik dan flagela yang merupakan filamen tipis dan lebih panjang untuk berenang (Berg, 2004). Lapisan selubung sel yang terdapat di antara membran sitoplasma dan kapsul disebut dinding sel. Dinding sel pada bakteri Gram negatif terdiri dari peptidoglikan dan membran luar. Dinding sel berperan penting sebagai proteksi

terhadap tekanan osmotik internal yang mencapai 5-20 atm dan juga berperan dalam pembelahan sel. Pada umumnya dinding sel bersifat permeabel non selektif (Brooks *et al.*, 2007). Namun, membran luar ekstrasitoplasmik bakteri Gram negatif (Fauci *et al.*, 2008) dapat menghambat perpindahan molekul-molekul yang berukuran besar (Brooks *et al.*, 2007). Membran luar ini merupakan suatu lipid bilayer dengan protein, lipoprotein dan polisakarida. 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 antimikroba (Fauzi *et al.*, 2008).

2.1 Morfologi *E. coli* dilihat dengan *scanning electron mikroskop*



2.1.3 Struktur Antigenik

E. coli memiliki 3 jenis antigen yaitu antigen somatik (antigen O) yang bersifat tahan panas, antigen permukaan (antigen K) yang tidak tahan panas, antigen flagel (antigen H). Antigen O yang merupakan bagian terluar dari lipolisakarida dinding sel dan terdiri atas unit polisakarida yang berulang. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol dan biasanya dideteksi dengan aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O terutama IgM. Antigen K berada diluar

antigen O. Antigen K dapat mengganggu aglutinasi melalui antiserum O dan dapat berhubungan dengan virulensi misalnya antigen K pada *E. coli* menyebabkan pelekatan bakteri pada sel epitel sebelum invasi ke saluran cerna atau saluran kemih. Sedangkan antigen H terletak pada flagel dan didenaturasi atau dirusak oleh panas atau alkohol. Antigen H dipertahankan dengan memberikan formalin pada varian bakteri yang bergerak seperti pada *E. coli* (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.4 Klasifikasi

Pada manusia sehat, *E. coli* merupakan bakteri Gram negatif dominan flora kolon manusia. Meskipun beberapa strain *E. coli* tidak berbahaya, namun beberapa dapat menimbulkan berbagai penyakit pada manusia. Salah satu *E. coli* patogen yang umum adalah *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Enterotoxinogenic E. coli* (ETEC), *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), *Enteroadgregative E. coli* (EAaggEC) (Bolton *et al.*, 2009).

Enteropatogenic E. coli (EPEC) dapat menempel pada sel mukosa usus halus sehingga menyebabkan hilangnya mikrovili (penumpulan) dan terkadang EPEC masuk ke dalam mukosa. Infeksi EPEC menyebabkan diare encer yang biasanya sembuh sendiri tapi dapat pula menjadi kronis.

Enterotoxigenic E. coli (ETEC) merupakan strain *E. coli* yang paling sering menyebabkan endemik diare. Penyakit disebabkan oleh toksinnya yaitu *heat-labile toxin* (LT-1) dan *heat-stabile toxin* (STa) yang menyebabkan sekresi cairan secara melimpah melalui aktivasi adenilsiklase dan guanilatsiklase pada jejunum dan ileum. Hal ini menyebabkan terjadinya *watery diarrhea* disertai kram. LT-1 terdiri dari subunit A dan B, dan secara struktural dan fungsional sama dengan toksin kolera.

Enterohemoragic E. coli (EHEC) menimbulkan kolitis hemolitik, diare yang berat, anemia hemolitik mikroangiopati dan trombositopenia.

Enteroinvasive E. coli (EIEC) tidak memfermentasikan laktosa atau memfermentasikan laktosa secara lambat dan nonmotil. EIEC menimbulkan penyakit dengan menginvasi sel epitel mukosa usus.

Enteroagregative E. coli (EAEC) menyebabkan diare akut dan kronik (durasi >14 hari) yang ditularkan melalui makanan. EAEC menghasilkan toksin mirip-ST dan hemolisin (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.5 Penyakit yang disebabkan *E. coli*

E. coli dapat menyebabkan berbagai penyakit tergantung dari tempat infeksi, seperti infeksi saluran kemih dan diare. *E. coli* adalah penyebab infeksi saluran kemih yang paling sering pada sekitar 90% infeksi saluran kemih pertama pada wanita muda. Gejala dan tanda-tandanya antara lain sering berkemih, disuria, hematuria dan piuria. Nyeri pinggang disebabkan oleh infeksi saluran kemih bagian atas. Tidak ada satupun tanda dan gejala yang khas bentuk infeksi *E. coli* (Brooks *et al.*, 2007).

Kemungkinan terjadinya infeksi saluran kemih bergantung pada virulensi bakteri yang menginfeksi dan kondisi pejamu. Infeksi *E. coli* pada saluran kemih dapat menimbulkan pielonefritis akut dan kronik, sistitis akut dan bakteriuria asimtomatik (Vranes *et al.*, 2001).

Selain infeksi saluran kemih *E. coli* dapat menyebabkan diare. *E. coli* ini diklasifikasikan berdasarkan sifat virulensinya dan masing-masing kelompok menyebabkan diare dengan mekanisme yang berbeda. Sifat perlekatan sel epitel usus halus atau usus besar dan pembentukan toksin dikodekan dan dikontrol oleh gen di plasmid (Brooks, *et al* 2007). Diare yang disebabkan *E. coli* seringkali berupa diare berdarah dan dapat berkembang menjadi *Hemolytic Uremic Syndrome* (HUS) yang ditandai dengan gagal ginjal akut, trombositopenia dan anemia hemolitik (Boltonetal., 2009; Nirwati *et al.*, 2008).

Escherichia coli juga dapat menyebabkan sepsis bila pertahanan pejamu yang normal tidak adekuat. Neonatus mungkin sangat rentan terhadap sepsis akibat *E. coli* karena sedikitnya kadar antibody IgM. Sepsis juga dapat terjadi karena infeksi saluran kemih (Brooks *et al.*, 2007).

2.2 Tanaman kakao (*Theobroma cacao*)

Tanaman kakao merupakan keturunan genus *Theobroma*, salah satu kelompok kecil tanaman yang berasal dari hulu sungai Amazon dan daerah-daerah tropika lain di Amerika Tengah serta Amerika Selatan. Terdapat lebih dari 20 spesies dalam genus ini, tetapi hanya *Theobroma cacao* yang dibudidayakan dan memberikan nilai ekonomis.

Sistematika tanaman cacao menurut klasifikasi botanis adalah sebagai berikut:

Tabel 2.2 Klasifikasi ilmiah kakao

Kakao (<i>Theobroma cacao</i>)	
Kingdom	<i>Plantae</i>
Divisi	<i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	<i>Angiospermae</i>
Kelas	<i>Dicotyledoneae</i>
Sub Kelas	<i>Dialypetalae</i>
Ordo	<i>Malvales</i>
Famili	<i>Sterculiaceae</i>
Genus	<i>Theobroma</i>
Spesies	<i>Theobroma cacao</i>

Sumber: Siregar *et al.* 2002.

Menurut Sunanto (1992), terdapat tiga jenis tanaman kakao yang banyak dibudidayakan, yaitu:

1. *Criollo*

Criollo adalah tanaman kakao yang memiliki mutu tinggi dan fermentasinya cepat, seperti kakao mulia atau edel kakao. Jenis ini memiliki buah yang berwarna merah atau hijau dan kulit buahnya tipis sehingga mudah diiris. Bijinya berbentuk bulat telur dan berukuran besar dengan kotiledon berwarna putih pada saat basah.

2. *Forastero*

Forastero memiliki buah berwarna hijau, bijinya tipis/gepeng dengan kotiledon berwarna ungu pada waktu masih basah. Biji yang dihasilkan dari jenis ini mempunyai mutu sedang atau dikenal dengan bulk kakao.

3. *Trinitario*

Trinitario adalah tanaman kakao yang merupakan hasil persilangan alami antara *Criollo* dan *Forastero*. Jenis ini mempunyai buah berwarna hijau atau merah dengan bentuk biji yang bermacam-macam. Kotiledonnya berwarna ungu muda sampai ungu tua pada waktu basah. Biji yang dihasilkan dari jenis ini termasuk jenis edel kakao atau bulk kakao.

Jenis kakao yang menghasilkan cita rasa coklat yang lembut dengan warna yang cerah adalah *Criollo* sedangkan jenis *Forastero* memiliki cita rasa coklat kuat dan warna yang gelap karena banyak mengandung polifenol dan antosianin (Siregar *et al.*, 2002).

Buah kakao memiliki bagian-bagian antara lain kulit buah, pulp, plasenta, dan biji. Buah akan mencapai pertumbuhan maksimal dan mulai masak setelah 143 hari dan masak betul setelah 170 hari dengan ditandai dinding buah berwarna kekuningan/oranye.

2.2.1 Sejarah Kakao

Kakao berasal dari Amazon atau Orinoco, Amerika Selatan kira-kira 4000 tahun yang lalu. Pohon kakao pertama kali dikenal dengan nama “kakaw” bahasa yang digunakan oleh suku Olmec, suku yang berasal dari teluk Meksiko yang merupakan cikal bakal dari peradaban Mesoamerika. Pada waktu tersebut terlihat bahwa bangsa Olmec sudah membudidayakan pohon-pohon kakao. Suku Maya yang terdapat di bagian utara Guatemala mengadopsi kata “kakaw” dari suku Olmec. Pada tahun ini suku Maya juga membudidayakan pohon kakao. Biji kakao diduga memiliki kekuatan sihir yang menakjubkan oleh bangsa Maya dan digunakan secara hati-hati dalam ritual, upacara keagamaan, dan penyembuhan oleh para pendeta.

Bangsa Maya menggunakan kakao sebagai pengobatan untuk demam, batuk, bahkan untuk menghilangkan rasa tidak nyaman selama hamil. Setelah menghilangnya suku Maya, suku Aztec memperkuat daerah kekuasaannya di Meksiko. Bagi suku Aztec biji kakao merupakan “*makanan para dewa*” (*theobroma*, dari bahasa Yunani). Suku Aztec berpikir bahwa kakao berguna

dalam memerangi kelelahan. Bahkan, itu diberikan kepada prajurit sebelum pertempuran. Setelah ditaklukkannya Amerika Tengah oleh Spanyol pada abad ke-16, Cortes memperkenalkan kakao ke wilayah Eropa, di mana kakao secara khusus dianggap sebagai bahan makanan sehat dan bergizi. Kemudian, di Eropa, Gereja Katolik diperbolehkan untuk coklat untuk dikonsumsi selama masa Prapaskah karena dianggap memiliki nilai gizi (Ruzaidi *et al.*, 2008).

2.2.2 Biji Kakao

Biji kakao terdiri atas tiga lapisan, yaitu lapisan terluar disebut pulp, kulit ari disebut juga testa, dan lapisan dalam disebut kotiledon. Prosentase biji kakao di dalam buahnya hanya sekitar 27-29% (Mulato dan Widyotomo, 2004). Di dalam buah, biji kakao tersusun dalam lima baris dan jumlahnya beragam antara 20-50 biji per buah. Pada buah muda, biji menempel pada kulit bagian dalam, tetapi bila buah masak, maka biji akan terlepas dari kulit buah dan berbunyi bila digoncang.

2.2.3 Kandungan biji Kakao

Prosentase kulit biji antara 10-14% dari berat biji kering, sedangkan prosentase dari keping biji sekitar 86-90% dari berat kering biji kakao. Komposisi kimia biji kakao dapat dilihat pada Tabel 2.6.

Tabel 2.3 Komposisi kimia biji kakao

Komponen	Keping biji (%)	Kulit biji (%)
Kadar air	5.0	4.5
Lemak	54.0	1.5
Kafein	0.2	-
Theobromin	1.2	1.4
Polihidroksifenols	6.0	-
Protein kasar	11.5	10.9
Pati	6.0	-
Pentosa	1.5	7.0
Selulosa	9.0	26.5
Asam Karboksilat	1.5	-
Abu	2.6	8.0
Komponen lain	1.5	0.1

Sumber: Belitz and Grosch. 1999.

2.2.4 Polifenol dan flavonoid kakao

Polifenol adalah asam fenolik dan flavonoid yang banyak terkandung pada buah-buahan, sayuran serta biji-bijian. Sejumlah besar fenol baik yang memiliki berat molekul rendah maupun tinggi menunjukkan kemampuan sebagai antioksidan melawan oksidasi lipid. Selain itu, senyawa fenol juga diketahui memiliki sifat antibakteri, antivirus, dan antimutagenik, dan antikarsinogenik (Supriyono, 2008). Menurut Forysth (dalam Hastuti, 2010), yang termasuk polifenol kakao adalah flavonoid dan asam fenol. Kandungan polifenol dalam kakao, dalam hal ini bubuk kakao lebih tinggi dibandingkan dengan anggur merah maupun teh, baik teh hitam maupun teh hijau.

Kim dan Keeney (dalam Misnawi, 2003) menyebutkan bahwa berdasarkan percobaan kromatografi, dapat diidentifikasi konsentrasi polifenol utama dalam kakao forastero yaitu delapan senyawa dalam tiga fraksi utama yaitu katekin, leukosianidin dan antosianin telah teridentifikasi, fraksi lain yang bergerak sangat lambat dalam kromatografi kertas diduga sebagai tannin kompleks. Sementara itu, menurut Wollgast dan Anklam (dalam Misnawi, 2003) polifenol kakao utama adalah monomer dan oligomer dari flavan-3-ol sebagai komponen dasar.

Tabel 2.4 Komposisi polifenol dalam biji kakao Forastero

Fraction		Percentage in	
		Dry Weight	Total Polyphenol
Catechins	(-)- Epicatechin	2,75	35
	(+)- Catechin		
	(+)- Gallocatechin	0,25	3
	(-)- Epigallocatechin		
			33-42
Leucocyanidins	Leucocyanidins 1	1,6	21
	Leucocyanidins 2, 3	0,8	10
			25- 39
Antocyanins	3- α -L-Arabinosydydyl-cyanidin	0,3	2,5
	3- α -L-Arabinosydydyl-cyanidin	0,3	2,5
			5
Compleks tannins		2,0	24-40

Sumber: Kim and Keeney dalam Misnawi (2003)

Polifenol juga dikenal dengan nama *soluble tannin*, merupakan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun, biji, dan buah dari tumbuhan tingkat tinggi. Keberadaannya dalam bidang pangan menjadi penting setelah dijadikan diet manusia dan menyumbang terhadap cita rasa makanan (Baxter *et al.*, 1997 dalam Misnawi, 2003b). Polifenol dalam produk cokelat bertanggung jawab atas pembentukan rasa sepat melalui mekanisme pengendapan protein-protein yang kaya prolin dalam air ludah dan menyumbang rasa pahit khas cokelat bersama alkaloid, beberapa amino, peptida, dan pirazin (Misnawi, 2003a).

Penelitian secara *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa polifenol biji kakao memiliki antioksidan yang mampu menekan hydrogen peroksida dan anion superoksida, melindungi lemak dari kerusakan oksidasi, bertindak sebagai antiulserik, antimikroba, antikarsinogenik, antimutagenik, menghambat pertumbuhan tumor dan kanker, serta mengurangi penyakit-penyakit karena oksidasi *low density lipoprotein* (Kattenberg, 2000; Osakabe *et al.*, 2000, 1998a, 1998b).

Berdasarkan percobaan kromatografi, Kim dan Keeney dalam Misnawi (2003b) dapat diidentifikasi dan diperkirakan konsentrasi polifenol utama dalam kakao *Forastero*. Delapan senyawa dalam tiga fraksi utama, yaitu katekin, leukosianidin, dan antosianin telah teridentifikasi, fraksi lain yang bergerak sangat lambat dalam kromatografi kertas diduga sebagai tanin kompleks.

Katekin adalah senyawa polifenol alami, yang merupakan metabolit sekunder dan termasuk dalam penyusun golongan tannin (Hastuti., 2010). Menurut Wahlyo (dalam Setiadevi., 2010), katekin memiliki sifat sebagai antimikroba, memperkuat pembuluh darah, melancarkan air seni dan menghambat pertumbuhan kanker. Katekin merupakan senyawa fenol. Fenol berikatan dengan protein melalui ikatan hydrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu. Gangguan integrasi sitoplasma berakibat pada lolosnya makromolekul, dan ion dari sel. Sel bakteri menjadi kehilangan bentuknya, dan terjadilah lisis (Susanti, 2011).

Tanin dinamakan juga asam tanat, ada yang berwarna kuning atau coklat tapi ada juga yang tidak berwarna. Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu astringen, antidiare, antibakteri, dan antioksidan. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri menurut Jambang (2004) berhubungan dengan kemampuan tanin dalam menginaktivasi adhesi sel mikroba yang terdapat pada permukaan sel, yaitu melalui enzim yang terikat pada membran sel dan polipeptida dinding sel.

Tanin yang mempunyai target pada polipeptida dinding sel akan menyebabkan kerusakan membran sel yaitu hilangnya sifat permeabilitas membran sel, sehingga keluar masuknya zat-zat seperti air, nutrisi, enzim tidak terseleksi. Apabila enzim keluar dari dalam sel, maka akan terjadi hambatan metabolisme sel dan selanjutnya akan mengakibatkan terhambatnya pembentukan ATP yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel.

Pada dasarnya tanin mengganggu permeabilitas sel dengan mengkerutkan dinding sel atau membran sel. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah, 2004).

2.3 Antimikroba

Antimikroba ialah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia. Dalam pembicaraan ini yang dimaksudkan dengan mikroba terbatas pada jasad renik yang tidak termasuk kelompok parasit. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dibagi dalam lima kelompok :

1. Antimikroba yang menghambat metabolisme sel mikroba

Antimikroba yang masuk dalam kelompok ini ialah sulfonamide, trimetoprim, asam p-aminosalisilat (PAS) dan sulfon. Dengan mekanisme kerja ini diperoleh efek bakterostatik. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman pathogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila sulfonamide atau sulfon menang bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya kehidupan mikroba akan terganggu. Berdasarkan sifat kompetisi, efek sulfonamide dapat diatasi dengan meningkatkan kadar PABA.

2. Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel mikroba

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 dan diakhiri oleh penisilin dan sefalosporin yang terkahir dalam rangkaian reaksi 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 peka.

3. Antimikroba yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba

Obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah polimiksin, golongan polien serta berbagai antimikroba kemoterapeutik, umpamanya antiseptik surface active agents. Polimiksin sebagai senyawa ammonium-kuaterner dapat merusak membrane sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membrane sel mikroba

4. Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Obat yang termasuk dalam kelompok ini ialah golongan aminoglikosida, makrolid, linkomisin, tetrasiklin dan kloramfenikol. Untuk kehidupannya, sel mikroba perlu mensintesis berbagai protein. Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S. Penghambatan sintesis protein terjadi dengan berbagai cara. Streptomisin berikatan dengan komponen ribosom 30S dan menyebabkan kode pada mRNA salah baca oleh tRNA pada waktu sintesis protein. Akibatnya akan terbentuk protein yang abnormal dan nonfungsional bagi sel mikroba. Antibiotik aminoglikosid lainnya yaitu gentamisin, kanamisin, dan neomisin memiliki mekanisme kerja yang sama namun potensialnya berbeda

5. Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel mikroba

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah rifampisin, dan golongan kuinolon. Yang lainnya walaupun bersifat antimikroba, karena sifat sitotoksitasnya, pada umumnya hanya digunakan sebagai obat antikanker, tetapi beberapa obat dalam kelompok terakhir ini dapat pula digunakan sebagai antivirus.

2.4 Antibiotika untuk *E. coli*

Resistensi terhadap beberapa antibiotik telah banyak dilaporkan. Penelitian tentang pola kepekaan kuman terhadap antibiotik di ruang rawat intensif RS Fatmawati Jakarta dalam kurun waktu dua tahun (2001-2002) melaporkan bahwa tingkat resistensi bakteri *E. coli* terhadap antibiotik yaitu golongan penicillin (ampisilin: 100%, penicillin G: 94,5%, amoksisilin: 86,2%), golongan sefalosporin (sefaleksin: 57%), golongan aminoglikosida (kanamisin: 62,5%) (Refdanita *et al.*, 2004). Sebuah penelitian *Antimicrobial Resistance in Indonesia*, 43% bakteri *E. coli* telah resisten terhadap beberapa antibiotik, diantaranya yaitu ampisilin, kotrimoksazol dan klormfenikol.

Pada penelitian tersebut juga melaporkan tingkat sensitivitas bakteri *E. coli* terhadap antibiotik yaitu golongan sefalosporin (seftriakson: 100%), golongan aminoglikosida (amikasin: 92,6%), golongan penicillin (amoksisilin-asam klavulanat: 87,5%), golongan lain (fosfomisin: 83,7%) (Refdanita *et al.*, 2004).

2.5 Ceftriaxone

Pemberian antibiotik merupakan pengobatan utama dalam penatalaksanaan penyakit infeksi. Manfaat penggunaan antibiotik tidak perlu diragukan lagi, akan tetapi penggunaannya yang berlebihan akan segera diikuti dengan munculnya kuman kebal antibiotik, sehingga manfaatnya akan berkurang. Kuman-kuman kebal terhadap antibiotik telah menjadi masalah kesehatan yang sangat besar. Infeksi oleh kuman resisten terhadap berbagai antibiotik akan menyebabkan meningkatnya angka kesakitan dan angka kematian. Untuk mengatasi hal tersebut diperlukan antibiotik pilihan kedua atau bahkan ketiga yang lebih efektif dan mungkin mempunyai efek samping lebih banyak serta biaya yang lebih mahal dibanding dengan pengobatan standar, dan *E. coli* merupakan salah satu kuman yang resisten terhadap beberapa antibiotik.

Menurut data penelitian yang dilakukan Refdanita *et al.* (2004) *E. coli* mempunyai kepekaan tinggi berturut-turut terhadap *ceftriaxone* (100%), *amikasin* (92,6%), *seftizoksim* (92,3%), *amoksisilin-asam klavulanat* (87,5%), *netilmisin* (81,6%), *tobramisin* (81,3%) dan *sefotaksim* (80%). Resistensi tertinggi berturut-

turut diberikan untuk *ampisilin* (100%), *penisilin G* (94,5%), *amoksisilin* (86,2%), *kloramfenikol* (83,9%), *tetrasiklin* (83,9%) dan *sulbenisilin* (79,4%).

Ceftriaxone merupakan obat generasi ketiga dari sefalosporin. Keuntungan utama obat generasi ketiga sefalosporin adalah peningkatan aktivitas terhadap batang Gram negatif. Penggunaan obat generasi ketiga paling berguna adalah untuk membasmi bakterimia Gram negatif. Beberapa ciri penting obat generasi ketiga termasuk *ceftriaxone* adalah kemampuannya mencapai susunan saraf pusat dan muncul dalam cairan sumsum tulang dalam konsentrasi yang cukup untuk pengobatan meningitis yang disebabkan oleh batang Gram negatif.

Ceftriaxon dapat digunakan untuk pengobatan infeksi saluran kemih (ISK), bacterial septikemia meningitis, infeksi saluran nafas bagian bawah, otitis media bakteri akut, penyakit inflamasi pelvis (PID), dan gonorrhea. Sedangkan kontraindikasinya adalah hipersensitifitas terhadap *ceftriaxone*, komponen lain dalam sediaan dan sefalosporin lainnya serta pada neonatus hiperbilirubinemia (Dinkes,2006).

Ceftriaxone mempunyai mekanisme kerja menghambat sintesis mukopeptida di dinding sel bakteri. Obat ini diabsorpsi dengan baik setelah pemberian secara intramuscular dan didistribusi secara luas di dalam tubuh termasuk kelenjar empedu, paru, tulang, *Cerebrospinal Fluid* (CSF), plasenta, melalui amnion dan ASI. Ikatan protein 85-95 %. Waktu paruh eliminasi pada hepar dan fungsi ginjal yang normal adalah 5-9 jam. Obat ini mempunyai kadar puncak serum sekitar 1-2 jam setelah pemberian secara intramuscular dan diekskresi di urin 33-65% (Dinkes, 2006).

2.6 Ekstraksi

2.6.1 Definisi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Haryati, 2005). Simplisia adalah bahan alamiah yang

dipergunakan sebagai obat tradisional yang belum mengalami pengolahan apapun juga (Badan POM RI, 2005).

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan maupun hewan. Sebelum ekstraksi dilakukan biasanya bahan-bahan dikeringkan terlebih dahulu kemudian dihaluskan pada derajat kehalusan tertentu (Sinaga, 2009).

Tujuan pembuatan ekstrak tumbuhan obat adalah untuk menstandarisasi kandungannya sehingga menjamin keseragaman mutu, keamanan dan khasiat produk akhir. Keuntungan penggunaan ekstrak dibandingkan dengan simplisia asalnya adalah penggunaannya biasa lebih mudah dan dari segi bobot pemakaiannya lebih sedikit dibandingkan dengan bobot tumbuhan asalnya. Kesamaan khasiat dalam bentuk ekstrak dan simplisianya tidak jauh berbeda walaupun tidak sama persis, karena tidak semua zat yang berkhasiat dapat tersari dalam pelarutnya (Haryati, 2005).

2.6.2 Metode Pembuatan Ekstrak

Menurut Departemen Kesehatan RI (2000), terdapat beberapa metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi adalah proses penyaringan simplisia dengan cara perendaman menggunakan pelarut dengan sesekali pengadukan pada temperatur kamar (Sinaga, 2009).

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana, yaitu dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan pelarut. Cairan pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel, zat aktif yang terkandung dalam rongga sel akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan luar sel, maka larutan yang ada di dalam akan didesak keluar hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antar larutan di dalam sel dan di luar sel. Cairan pelarut yang dapat digunakan berupa air, etanol, dan pelarut lain. Keuntungan cara penyarian dengan metode ini adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah dilakukan. Sedangkan kerugiannya adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Ningsih *et al.*, 2009).

2.7 Scanning Elektron Mikroskop (SEM)

Pada tahun 1920 ditemukan suatu fenomena di mana elektron yang dipercepat dalam suatu kolom elektromagnet, dalam suasana hampa udara (vakum) berkarakter seperti cahaya, dengan panjang gelombang yang 100.000 kali lebih kecil dari cahaya. Selanjutnya ditemukan juga bahwa medan listrik dan medan magnet dapat berperan sebagai lensa dan cermin seperti pada lensa gelas dalam mikroskop cahaya. Kedua penemuan inilah yang merupakan dasar penciptaan mikroskop elektron.

Seorang ilmuwan dari Universitas Berlin yaitu Dr. Ernst Ruska bersama rekannya, Bodo von Borries, menggabungkan penemuan ini dan membangun mikroskop transmisi elektron yang pertama pada tahun 1931. Untuk hasil karyanya ini maka dunia ilmu pengetahuan menganugerahinya hadiah Penghargaan Nobel dalam fisika pada tahun 1986.

Mikroskop yang pertama kali diciptakannya adalah dengan menggunakan dua lensa medan magnet, namun tiga tahun kemudian ia menyempurnakan karyanya tersebut dengan menambahkan lensa ketiga dan mendemonstrasikan kinerjanya yang menghasilkan resolusi hingga 100 nanometer (nm) (dua kali lebih baik dari mikroskop cahaya pada masa itu). Mikroskop transmisi elektron saat ini telah mengalami peningkatan kinerja hingga mampu menghasilkan resolusi hingga 0,1 nm (atau 1 angstrom) atau sama dengan pembesaran sampai satu juta kali.

Meskipun banyak bidang-bidang ilmu pengetahuan yang berkembang pesat dengan bantuan mikroskop transmisi elektron ini, namun adanya persyaratan bahwa obyek yang diamati harus setipis mungkin, membuat sebagian peneliti tidak puas, terutama yang memiliki obyek yang tidak dapat dibuat setipis mungkin. Dalam perkembangannya masalah ini terpecahkan dengan ditemukannya sebuah alat yang disebut mikrotom. Dengan alat ini spesimen bisa disayat dengan sangat tipis.

Agar pengamat dapat mengamati preparat dengan baik, diperlukan persiapan sediaan preparat. Prinsip penyediaan preparat untuk mikroskop elektron adalah sebagai berikut :

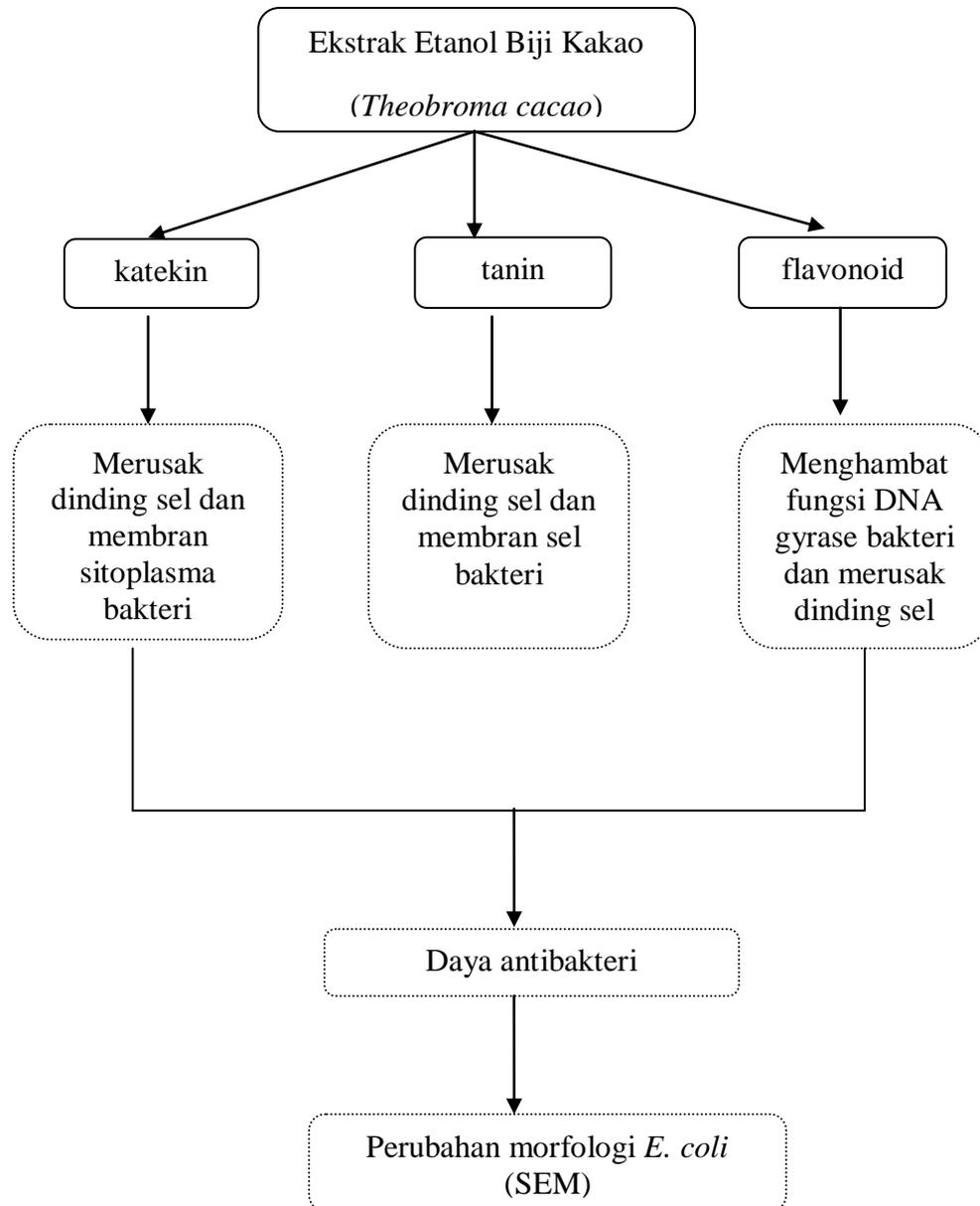
1. Melakukan fiksasi: bertujuan untuk mematkan sel tanpa mengubah struktur sel yang akan diamati. Fiksasi dapat dilakukan dengan menggunakan senyawa *glutaraldehida*.
2. Pelapisan/pewarnaan : bertujuan untuk memperbesar kontras antara preparat yang akan diamati dengan lingkungan sekitarnya. Pelapisan/pewarnaan dapat menggunakan logam berat seperti uranium dan timbal.

Salah satu jenis mikroskop elektron adalah *Scanning Electron Microscopy*. SEM digunakan untuk mengamati detail permukaan sel atau struktur mikroskopik lainnya, dan mampu menampilkan pengamatan obyek secara tiga dimensi. Tidak diketahui secara persis siapa sebenarnya penemu mikroskop pemindai elektron ini. Publikasi pertama kali yang mendiskripsikan teori SEM adalah fisikawan Jerman Dr. Max Knoll pada 1935, meskipun fisikawan Jerman lainnya Dr. Manfred von Ardenne mengklaim dirinya telah melakukan penelitian suatu fenomena yang kemudian disebut SEM hingga tahun 1937. Mungkin karena itu, tidak satu pun dari keduanya mendapatkan hadiah nobel untuk penemuan itu. Pada 1942 tiga orang ilmuwan Amerika yaitu Dr. Vladimir Kosma Zworykin, Dr. James Hillier, dan Dr. Snijder, membangun sebuah mikroskop elektron metode pemindaian (SEM) dengan resolusi hingga 50 nm atau magnifikasi 8.000 kali. Sebagai perbandingan SEM modern sekarang ini mempunyai resolusi hingga 1 nm atau pembesaran 400.000 kali. Mikroskop elektron ini memfokuskan sinar elektron (*electron beam*) di permukaan obyek dan mengambil gambarnya dengan mendeteksi elektron yang muncul dari permukaan obyek.

Cara terbentuknya gambar pada SEM berbeda dengan apa yang terjadi pada mikroskop optik. Pada SEM, gambar dibuat berdasarkan deteksi elektron baru (elektron sekunder) atau elektron pantul yang muncul dari permukaan sampel ketika permukaan sampel tersebut dipindai dengan sinar elektron. Elektron sekunder atau elektron pantul yang terdeteksi selanjutnya diperkuat sinyalnya, kemudian besar amplitudonya ditampilkan dalam gradasi gelap-terang pada layar monitor *cathode ray tube* (CRT). Di layar CRT inilah gambar struktur obyek yang sudah diperbesar bisa dilihat. Pada proses operasinya, SEM tidak memerlukan

sampel yang ditipiskan, sehingga bisa digunakan untuk melihat obyek dari sudut pandang 3 dimensi.

2.8 Kerangka Konseptual Penelitian



2.2 Skema kerangka konseptual

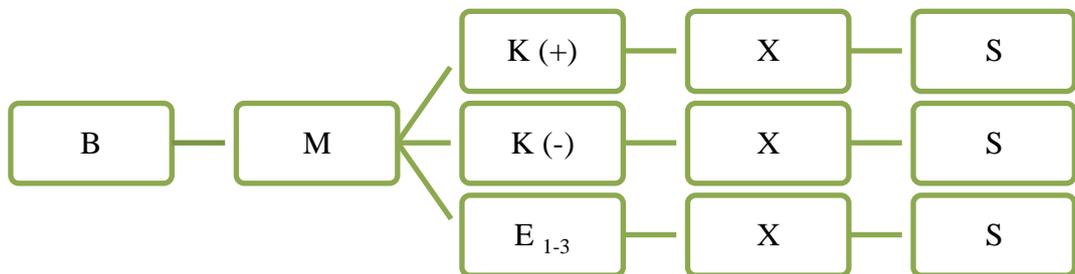
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental semu (*Quasi Experimental Design*). Pada perlakuan ini tidak dilakukan randomisasi karena semua sampel telah homogen (Praktiknya., 2008).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan eksperimental sederhana (*Posttest Only Control Group Design*). Rancangan penelitian eksperimental ini, sampel dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Pratiknya., 2008). Rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



B : Biakan bakteri *E. coli*

M : Media *Muller Hinton Broth* (MHB)

K(+): Kelompok kontrol positif *ceftriaxone* 8µg/ml

K(-): Kelompok kontrol negatif (aquades steril)

X : Inkubasi selama 20 jam dengan suhu 35°C

E1-3 : Ekstrak konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml, 7,8 mg/ml

S : *Scanning Microskop Electron*

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian uji aktivitas antibakteri

3.3 Uji Perubahan Morfologi Bakteri

Metode yang digunakan untuk pengamatan perubahan morfologi bakteri *E. coli* adalah uji *Scanning Mikroskop Electron. Muller Hinton Broth* (MHB) media (Becton Dickinson) digunakan sebagai media bakteri untuk pengamatan SEM (Forbes et al., 2002).

3.4 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah koloni bakteri *E. coli* yang disesuaikan dengan standar 0,5 *Mc Farland* (10^6 CFU/ml) dan bakteri tersebut diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.5 Tempat dan Waktu Penelitian

3.5.1 Tempat Penelitian

Tempat pembuatan media bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan pembuatan ekstrak etanol biji kakao dilakukan di Laboratorium Pasca Panen Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia serta tempat pengamatan perubahan morfologi bakteri dilakukan di laboratorium Mikroskop Elektron Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

3.5.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September 2012.

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol biji kakao dengan konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml dan 7,8 mg/ml.

3.6.2 Variabel Terikat

perubahan morfologi bakteri *E. coli* yang kontak dengan ekstrak etanol biji kakao pada konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml dan 7,8 mg/ml.

3.6.3 Variabel Terkendali

- a. Pembuatan biakan bakteri *E. coli*, pembuatan ekstrak etanol biji kakao, media *Muller Hinton Broth* (MHB), autoklaf, inkubator, suspensi *ceftriaxone*, dan aquades steril.
- b. Suhu pengeraman (inkubasi) *E. coli* 35⁰C dan lama inkubasi 20 jam.
- c. Metode pengamatan pada *Scanning Microskop Electron*.
- d. Prosedur penelitian.

3.7 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol biji kakao hasil ekstraksi biji kakao dengan menggunakan pelarut etanol 90% dengan menggunakan biji kakao sebanyak 7 kg dan menghasilkan bubuk 170 Gram.
- b. Kontrol positif adalah bubuk *ceftriaxone* 8µg dilarutkan dalam aquadest steril lalu diambil sebanyak 100µl.
- c. Kontrol negatif adalah aquades steril sebanyak 100µl.
- d. *E. coli* adalah bakteri Gram negatif yang bersifat patogen pada manusia yang telah dikembangkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- e. Larutan *glutaraldehyde* adalah larutan fiksasi yang berfungsi untuk mencegah terjadinya kerusakan bakteri kecuali karena efek ekstrak sendiri.
- f. Perubahan morfologi *E. coli* adalah perubahan struktur *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao.

3.8 Alat dan Bahan

3.8.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini sterilisator, press hidrolik, maserasi, kertas saring, corong kaca, evaporator, vakum rotary (rotavapor), beker kaca, centrifuge, pipet pasteur, tabung reaksi, pengering titik kritis, evaporator vakum, *scanning microskop electron*.

3.8.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini:

Muller Hinton Broth, aquades steril, suspensi *E. coli*, ekstrak etanol biji kakao, suspensi *ceftriaxone*, spirtus, hexan, bahan pewarnaan untuk *scanning mikroskop elektron*.

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 Persiapan Alat

Semua alat yang akan dipakai dalam penelitian ini disterilkan dalam sterilisator panas kering selama 15 menit dengan suhu 110°C terlebih dahulu. Setelah itu bahan media disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C (Suswati and Mufida, 2009).

3.9.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Kakao

Tujuh ribu Gram biji kakao diblender dan dipress 5 mess dan dioven selama 1 jam dengan suhu 100°C untuk memudahkan proses pengepresan. Biji kakao dipisahkan dengan lemak kakao menggunakan pres hidrolik dan menghasilkan bubuk kakao. Kemudian bubuk kakao direndam dengan hexan selama 24 jam dengan perbandingan 1:2. Larutan yang diperoleh disaring dan dipres menggunakan pres hidrolik sehingga diperoleh bubuk kakao bebas lemak. Bubuk direndam dengan etanol selama 24 jam dengan perbandingan 1:3 sehingga dihasilkan larutan polifenol yang bercampur dengan etanol. Kemudian larutan polifenol di press kemudian dievaporasi menggunakan evaporator selama 3,5 jam dengan suhu 60°C dan menghasilkan ekstrak polifenol cair yang sesungguhnya. Kemudian ekstrak tersebut divakum sehingga terbentuk serbuk.

3.9.3 Pembuatan Larutan 0,5 Mc Farland

Standar *Mc Farland* dibuat dengan cara mencampur 9,95 ml asam sulfur 1% dengan 0,05 ml barium klorida 1%. Kemudian tabung disegel dan digunakan untuk perbandingan suspensi bakteri dengan standar (Saceed and Tariq, 2005).

3.9.4 Pembuatan Media

Menimbang 2,1 Gram *Muller Hinton Broth* (MHB) kemudian ditambahkan 100 ml aquades kemudian dipanaskan, kemudian memasukkan media kedalam tabung reaksi masing-masing 5 ml, kemudian di masukkan kedalam autoklaf.

3.9.5 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Biji Kakao

Ekstrak polifenol biji kakao (serbuk) ditimbang sebanyak 4000 mg lalu ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam vial I, ditambahkan dengan 4 ml aquades steril lalu divortex selama 60 detik sehingga ekstrak tersebut memiliki konsentrasi 1000 mg/ml. Dari vial I diambil sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam vial II yang sudah diisi dengan 2 ml aquades steril kemudian divortex selama 60 detik. Vial II dianggap memiliki konsentrasasi 500 mg/ml, kemudian dengan metode yang sama dilakukan pengenceran bertingkat dengan kelipatan setengahnya dengan penambahan 2 ml aquades steril sampai didapatkan larutan konsentrasi 7,8 mg/ml dan divortex selama 60 detik terlebih dahulu. Memberi label pada tabung untuk setiap kali pengenceran sesuai dengan konsentrasinya (Suswati and Mufida, 2009).

3.9.6 Pembuatan Suspensi *E. coli*

Bakteri *E. coli* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. *E. coli* yang dipergunakan dibuat dengan mengambil satu ose kuman dari kultur, kemudian dimasukkan ke dalam media *Nutrient Broth*, selanjutnya diinkubasi 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam suspensi kuman yang telah diinkubasi disesuaikan dengan standar larutan 0,5 Mc Farland (1×10^8 CFU/ml) dengan menambah aquades steril (Suswati and Mufida, 2009).

3.9.7 Pembuatan Suspensi *Ceftriaxone*

Kadar hambat minimal *ceftriaxone* untuk bakteri *E. coli* ialah 8 μ g (Ngawai *et al.*, 2011). Bubuk *ceftriaxone* diambil dari sediaan vial 1g i.v/i.m dan dilakukan pengenceran bertingkat dengan aquades steril. Kemudian diambil sebanyak 100 μ l.

3.9.8 Tahap Perlakuan

Membuat seri pengenceran ekstrak etanol biji kakao, kemudian dari masing- masing pengenceran ekstrak diambil 1ml, kemudian dimasukkan dalam tabung dan kemudian ditambahkan dengan 10 μ l suspensi kuman (konsentrasi yang diberi kuman hanya konsentrasi 7,8 mg/ml, 15,6 mg/ml, 31,25 mg/ml, kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif). Kemudian dieramkan selama 15-20 jam dalam suhu 35⁰C. Hasilnya disentrifuge kemudian bakteri dimasukkan ke dalam larutan fiksasi *glutaraldehyde* 2% selama 2-3 jam suhu 4⁰C (centrifuge dengan kecepatan rendah 15') setelah itu di cuci dengan larutan *buffer phosphate* pH 7,4 selama 3x masing-masing selama 5 menit dalam suhu 4⁰C (centrifuge dengan kecepatan rendah 15') kemudian post-fiksasi dengan dengan larutan *osmic acid* 1% selama 1-2 jam suhu 4⁰C (centrifuge dengan kecepatan rendah 15') kemudian dicuci dengan larutan *buffer phosphate* pH 7,4 selama 3x masing-masing selama 5 menit dalam suhu 4⁰C (centrifuge dengan kecepatan rendah 15') kemudian dehidrasi dengan alkohol bertingkat : 30%, 50%, 70% masing-masing selama 15-20 menit suhu 4⁰C (centrifuge dengan kecepatan rendah 15') dilanjutkan dehidrasi 80%, 90%, absolut 2x, masing-masing selama 15-20 menit suhu ruangan (centrifuge dengan kecepatan rendah 15') setelah itu diganti dengan *amyl acetate absolut* (sebagai pengawet sampai menunggu waktu pengeringan) kemudian bakteri yang akan dikeringkan di pipet dengan pipet pasteur dan diteteskan pada obyek glass dengan luas 16 mm² yang sudah dibersihkan dengan alkohol kemudian pengeringan dengan alat *Critical Point Dryng* (CPD) setelah itu dilakukan penempelan pada stup (holder) dengan menggunakan lem khusus kemudian Pelapisan dengan alat vakum evaporator dan

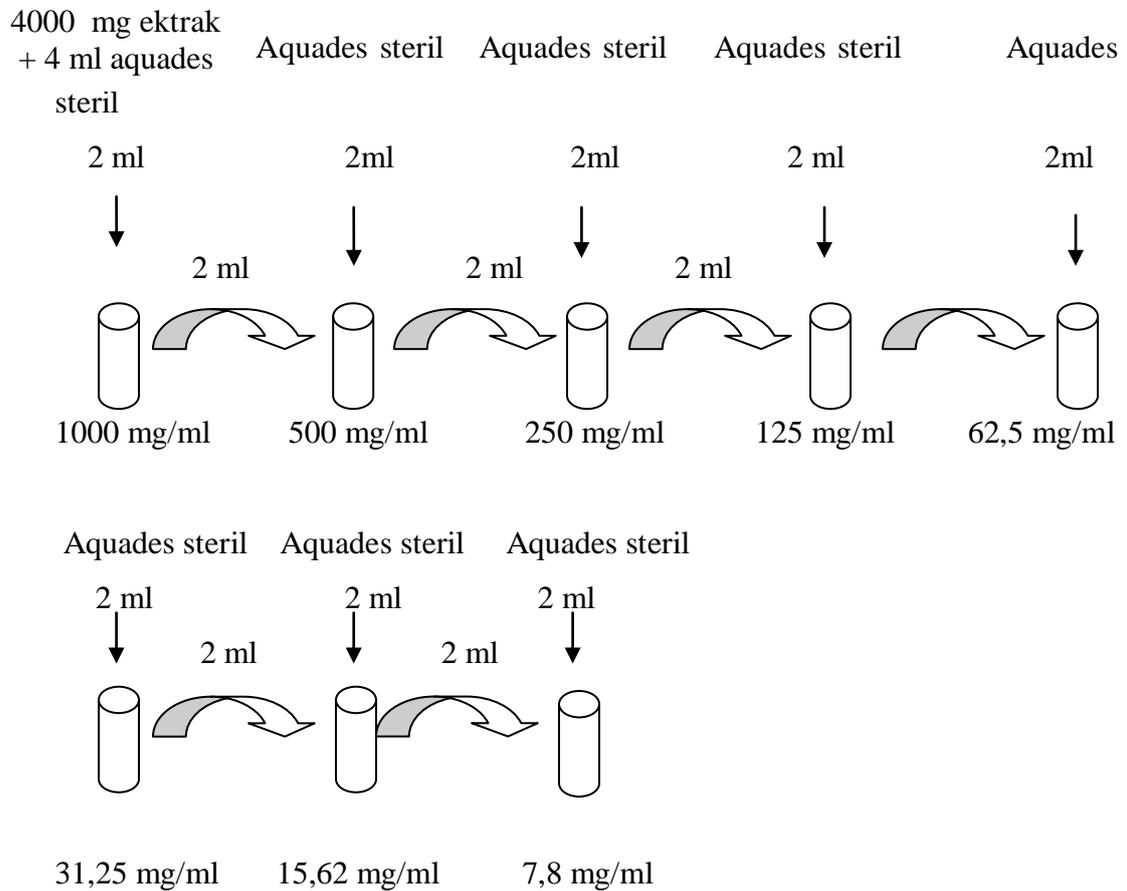
bahan pelapisnya adalah emas murni atau carbon. Siap diamati dan difoto dengan SEM dengan perbesaran yang dipilih.

3.10 Analisis Data

Analisis data yang digunakan untuk mengetahui perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao dilakukan analisis secara diskriptif.

3.11 Alur Penelitian

3.11.1 Pengenceran Ekstrak



Gambar 3.5 Skema pengenceran ekstrak

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Total Polifenol

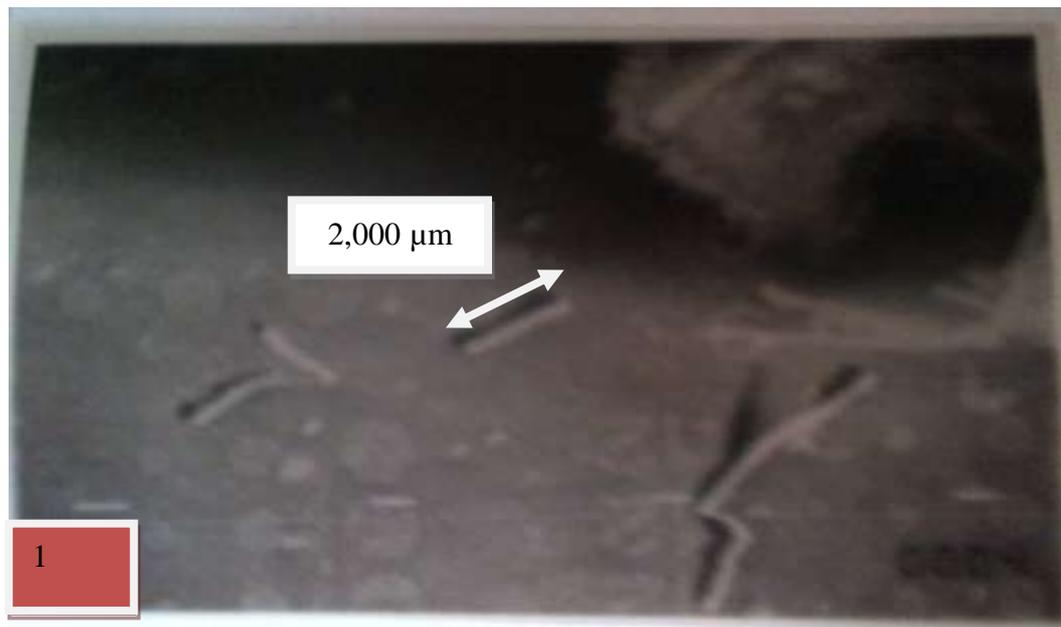
Total polifenol dihitung dari hasil absorbansi ekstrak polifenol kasar dibagi 50 ml pengenceran kemudian dibagi dengan 0,25 Gram bahan yang digunakan untuk analisa. Penentuan polifenol ini menggunakan standard (+)-katekin dengan konsentrasi 0-900 mg/L dan diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 765 nm. Untuk mengukur total polifenol, sebelumnya dilakukan pengukuran berdasarkan standard yang dibuat terlebih dahulu berdasarkan pengukuran absorbansi pada (+)-katekin yang direaksikan dengan Follin ciocalteau.

Konsentrasi (mg/5 mL)	Absorbansi
0	0.0001
100	0.0800
200	0.1194
400	0.2642
600	0.3373
800	0.4046
1000	0.4365

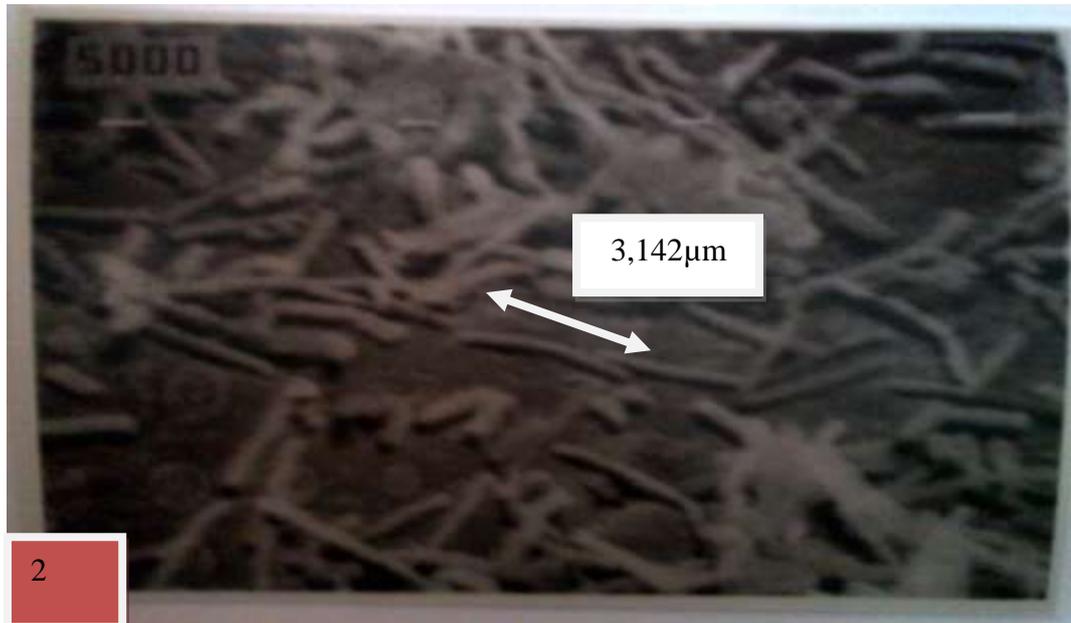
Nilai absorbansi tersebut kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva katekin yaitu $Y = 4,945335e-04 * X$. Kemudian diperoleh nilai x lalu dikali 50 sebagai faktor pengenceran lalu dibagi 0,25 g yang merupakan berat ekstrak yang dianalisa dan dibagi 10.000 untuk dijadikan persentase. Perlakuan diulang sebanyak 2 kali dan kemudian diambil nilai rata-rata kadar katekin yaitu sebesar 21,9 % (219 gr/kg)

4.1.2 Perubahan morfologi *E.coli* akibat ekstrak etanol biji kakao pada *Scanning Elektron Mikroskop*

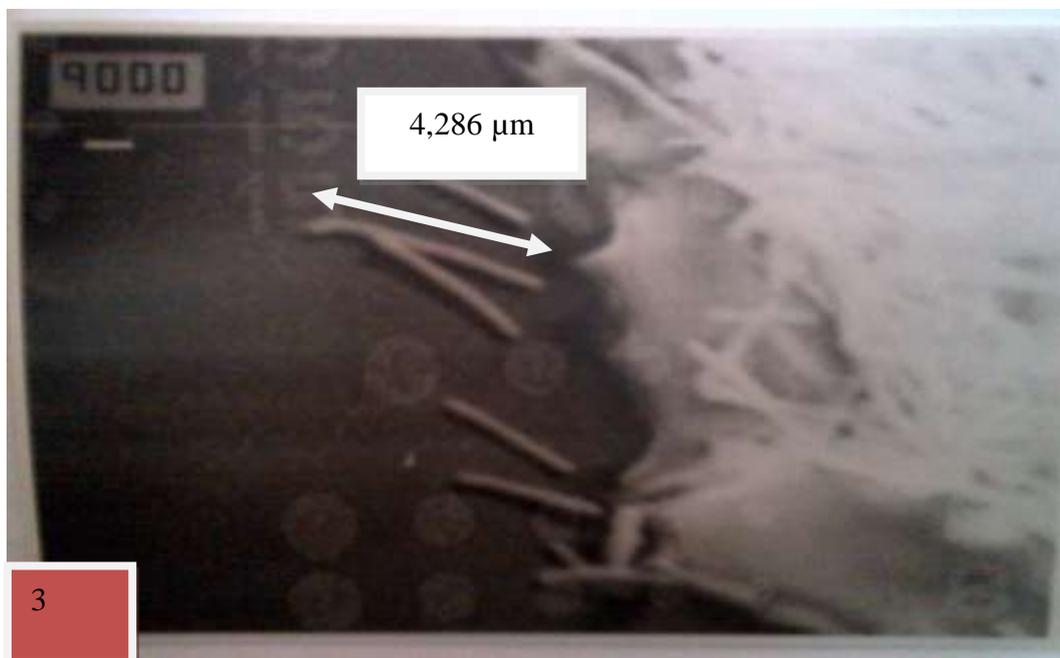
Perubahan morfologi *E.coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao pada media MHB dengan menggunakan SEM ditunjukkan dengan adanya perubahan morfologi berupa elongasi. Perubahan yang terjadi dapat dihitung dengan menggunakan penggaris. Perhitungan dapat dilakukan dengan mengukur skala pada foto positif, foto negatif, dan juga menggunakan perbesaran yang digunakan saat melihat bakteri dengan SEM. Hasil Penelitian dengan menggunakan konsentrasi 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml, 7,8 mg/ml, kontrol positif (*ceftriaxon*), kontrol negatif (aquades), di dapatkan perubahan morfologi seperti yang tercantum dalam gambar dibawah ini



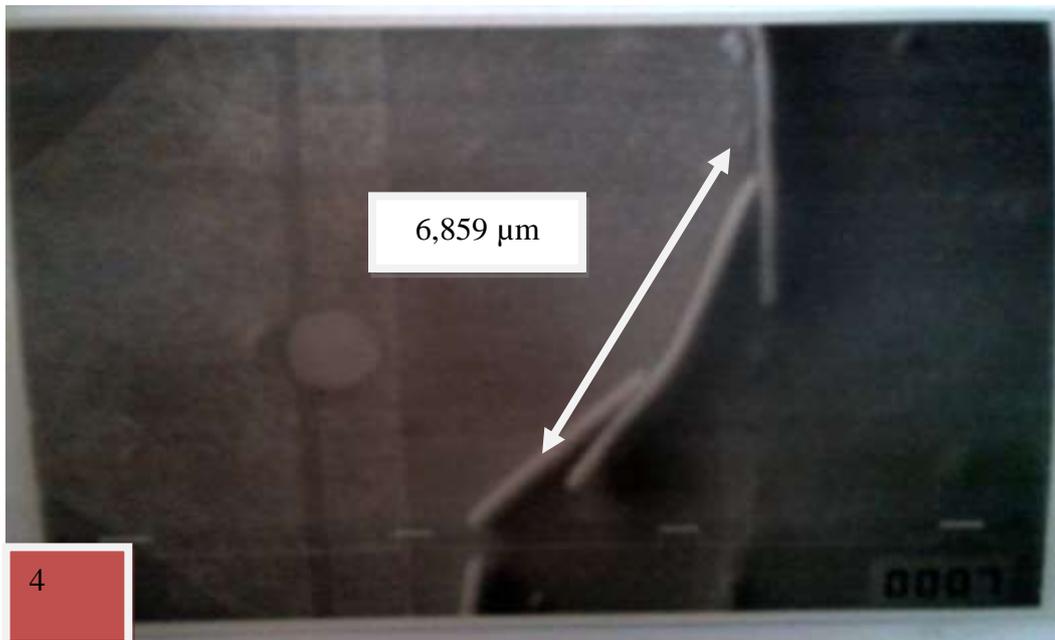
4.1 Gambar perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan aquades (kontrol negatif) pada perbesaran 3500 kali.



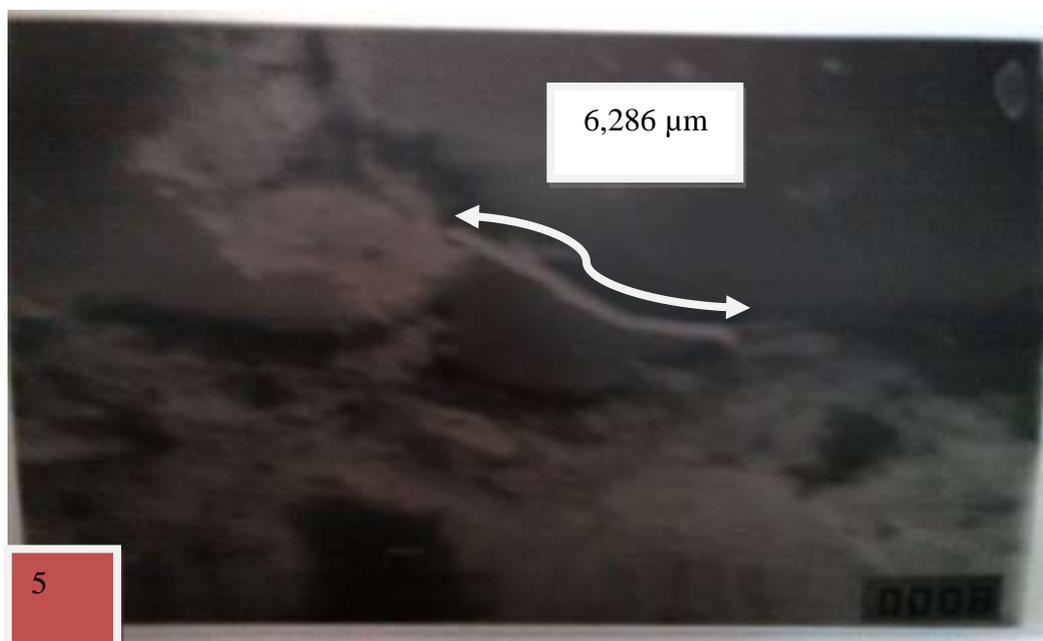
4.2 Gambar perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan *ceftriaxon* (kontrol positif) pada perbesaran 3500 kali



4.3 Gambar perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 7,8 mg/ml pada perbesaran 3500 kali



4.4 Gambar perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 15,6 mg/ml pada perbesaran 3500 kali



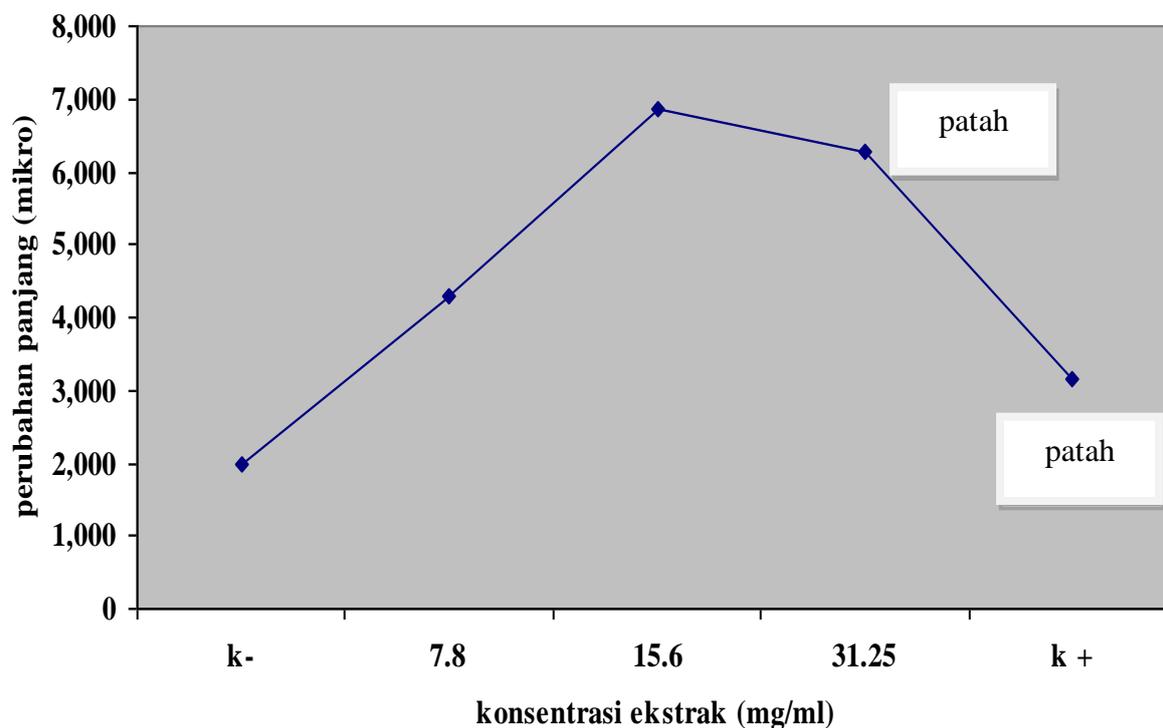
4.5 Gambar perubahan morfologi *E. coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao konsentrasi 31,25 mg/ml pada perbesaran 3500 kali

Berdasarkan gambar di atas, diketahui bahwa perubahan morfologi terbentuk pada konsentrasi 7,8 mg/ml hingga konsentrasi 31,25 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji kakao dapat merubah morfologi *E. coli* ditunjukkan dengan adanya elongasi (penambahan panjang). Pada konsentrasi 31,25 mg/ml terjadi elongasi namun pada konsentrasi ini bakteri nampak patah sehingga ukuran lebih pendek dari pada konsentrasi 15,6 mg/ml. Pada kelompok kontrol positif (*ceftriaxone*) menunjukkan hasil lebih kecil dari konsentrasi 7,8 mg/ml, 15,6 mg/ml dan 31,25 mg/ml namun terdapat bentuk lain ada yang patah dan tetap ada yang utuh. Selain terjadi elongasi bakteri *E. coli* juga berubah menjadi lebih kurus dibandingkan dengan normal. Oleh karena itu, ekstrak polifenol biji kakao yang dapat menimbulkan perubahan morfologi *E.coli* adalah mulai dari konsentrasi 7,8 mg/ml.

4.2 Analisis Data

Tabel 4.1 Hasil pengukuran perubahan morfologi *E. coli* berbagai konsentrasi ekstrak polifenol biji kakao

konsentrasi	Perbesaran	Foto positif (cm)	Foto negatif (cm)	Perubahan panjang (μm)
k+	3500 x	2,4	1,1	3,142 (patah)
31,25	3500 x	4	2,2	6,286 (patah)
15,6	3500 x	5,2	2,4	6,859
7,8	3500 x	3,2	1,5	4,286
k-	3500 x	1,5	0,7	2,000



Gambar 4.5 Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol biji kakao dengan perubahan morfologi *E. coli*

Berdasarkan tabel dan grafik di atas, diketahui bahwa perubahan morfologi terbentuk pada konsentrasi 7,8 mg/ml hingga konsentrasi 31,25 mg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji kakao dapat merubah morfologi *E. coli* ditunjukkan dengan adanya elongasi. Perhitungan pertambahan panjang tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan rumus SEM yaitu dengan menggunakan membandingkan antara foto positif dan foto negatif kemudian dikalikan dengan perbesaran yang digunakan (Lampiran B). Hasilnya semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin bertambah panjang, oleh karena itu, ekstrak polifenol biji kakao yang dapat menimbulkan perubahan morfologi *E.coli*.

4.3 Pembahasan

Habitat alam tanaman kakao berada di hutan beriklim tropis. Tanaman kakao banyak tumbuh di perkebunan-perkebunan di Indonesia. Indonesia merupakan salah satu negara yang membudidayakan tanaman kakao paling luas di

dunia. Indonesia adalah produsen kakao terbesar ketiga setelah Pantai Gading dan Ghana dengan produksi tahunan mencapai 540 ribu ton.

Pada penelitian ini, biji kakao diekstraksi secara maserasi. Berdasarkan literatur, metode ekstraksi secara maserasi ataupun perkolasi dapat digunakan untuk memperoleh ekstrak tanaman yang diduga mengandung bahan antimikroba dan akan diuji aktifitas antimikrobanya (Dey, 1991). Metode maserasi dilakukan dengan cara merendam biji kakao dalam cairan pelarut. Pelarut (cairan penyari) akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel, zat aktif yang terkandung dalam rongga sel akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel, maka larutan yang ada di dalam akan didesak keluar hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dengan di dalam sel. Keuntungan metode ini adalah cara pengerjaannya mudah dan peralatan yang digunakan sederhana, sedangkan kerugiannya adalah waktu pengerjaannya lama (Ningsih *et al.*, 2009).

Proses ekstraksi ini menggunakan pelarut etanol. Etanol dipilih sebagai pelarut proses ekstraksi dalam penelitian ini karena hampir semua senyawa tanaman yang punya aktivitas antimikroba merupakan senyawa aromatik atau terlarut dalam senyawa organik yang dapat dilarutkan melalui ekstraksi awal menggunakan etanol. Berdasarkan beberapa hasil penelitian dilaporkan bahwa etanol merupakan pelarut semipolar yang sangat baik untuk menarik senyawa golongan polifenol, fenol, glikosida, dan flavonoid yang terdapat dalam biomassa tumbuhan (Virganita, 2009). Polifenol dari biji kakao bersifat polar dan relatif stabil pada kondisi larutan asam sehingga polifenol dalam biji kakao lebih mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol. Etanol sebagai pelarut memiliki banyak kelebihan antara lain tidak beracun, netral, kuman sulit tumbuh dalam etanol 20 % ke atas, absorpsinya baik, dan tidak menyebabkan pembengkakan membran sel.

Pengujian perubahan *E.coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao dilakukan dengan menggunakan SEM. Bakteri *E.coli* merupakan patogen utama pada manusia dan sering ditemukan sebagai flora normal pada saluran pencernaan dan saluran kemih. Hampir semua orang pernah mengalami infeksi *E. coli* selama hidupnya dengan derajat keparahan yang beragam. Uji aktivitas antibakteri

dilakukan secara *in vitro* menggunakan menggunakan media MHB. Konsentrasi ekstrak etanol biji kakao yang digunakan adalah 31,25 mg/ml, 15,6 mg/ml, dan 7,8 mg/ml.

Pembuatan konsentrasi ekstrak polifenol biji kakao (*T. cacao*) dimulai dengan mencampur serbuk ekstrak biji kakao dengan aquades steril panas. Larutan aquades steril panas digunakan saat melakukan pengenceran bertingkat dan aquades steril sebagai kontrol negatif. Dalam polifenol biji kakao terdapat empat fraksi, yaitu katekin, proisianidin, antosianin, dan tanin yang bersifat polar dan mudah larut dalam air. Kontrol positif menggunakan serbuk *ceftriaxone* yang dicampur dengan aquades steril. Pemilihan obat ini didasarkan karena cara kerja *ceftriaxone* hampir sama dengan cara kerja dari ekstrak etanol biji kakao *ceftriaxon* merupakan golongan antibiotik sefalosporin generasi ketiga.

Penelitian yang dilakukan Refdanita *et al* (2004), melaporkan tingkat sensitivitas bakteri *E. coli* terhadap antibiotik yaitu golongan sefalosporin (*ceftriaxon*: 100%), golongan aminoglikosida (*amikasin*: 92,6%), golongan penicillin (*amoksisilin-asam klavulanat*: 87,5%), golongan lain (*fosfomisin*: 83,7%). Tingkat resistensi bakteri *E. coli* terhadap antibiotik yaitu golongan penicillin (*ampisilin*: 100%, *penicillin G*: 94,5%, *amoksisilin*: 86,2%), golongan sefalosporin (*sefaleksin*: 57%), golongan aminoglikosida (*kanamisin*: 62,5%).

Secara *in vitro*, *ceftriaxone* merupakan obat generasi ketiga dari sefalosporin. Keuntungan utama obat generasi ketiga sefalosporin adalah peningkatan aktivitas terhadap batang Gram negatif. *Ceftriaxone* mempunyai mekanisme kerja menghambat sintesis mukopeptida di dinding sel bakteri.

Dari Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa perubahan morfologi bakteri (elongasi) mulai terjadi pada konsentrasi 7,8 mg/ml dengan membandingkan hasil dari kontrol negatif.. Pada konsentrasi 31,25 mg/ml didapatkan hasil lebih pendek dibandingkan dengan konsentrasi 15,6 mg/ml namun pada konsentrasi ini bakteri mengalami patahan. Dari tabel dan gambar ini, disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji kakao dapat menimbulkan perubahan morfologi dan dapat menyebabkan terjadinya penurunan jumlah bakteri *E.coli*. Terjadinya kesan jumlah bakteri yang menurun dapat dilihat dengan perbesaran 1500 kali. Selain itu, dapat disimpulkan

juga bahwa terdapat perbedaan kemampuan antibakteri berbagai serial konsentrasi ekstrak yang ditunjukkan dengan semakin bertambah panjang (elongasi) dan terjadinya patahan dari konsentrasi 7,8 mg/ml sampai dengan 31,25 mg/ml, namun pada penelitian ini tidak dilakukan replikasi. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol biji kakao maka perubahan lebih signifikan. Penurunan jumlah tanpa disertai lisis atau kerusakan sel bakteri kemungkinan disebabkan karena penghambatan pembelahan sel bakteri, sedangkan pertambahan panjang (elongasi) hal ini hampir sama dengan penelitian yang pada *P. aeruginosa* yang di kontakkan dengan sulbenisilin dan terjadi elongasi dan ketika dilihat dengan menggunakan TEM ternyata terjadi kerusakan peptidoglikan tanpa merusak lapisan membran luar, jadi kemungkinan pada *E. coli* ini juga terjadi hal yang sama karena kandungan zat-zat aktif yang terkandung di dalam biji kakao yaitu tanin, katekin dan flavonoid (Aonuma *et al.*, 1987). Di dalam biji kakao terdapat katekin yang kerjanya berikatan dengan protein melalui ikatan hydrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak, dengan adanya katekin pada tanaman kakao maka struktur protein pada *E. coli* akan rusak. Tanin juga berperan yaitu dengan merusak peptidoglikan, selain itu flavonoid juga berperan dengan merusak dari dari dinding sel bakteri.

Ceftriaxon yang dijadikan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Perubahan morfologi yang terjadi pada kontrol positif menunjukkan hasil terjadi elongasi namun tidak lebih panjang dari pada perlakuan ekstrak, tetapi hasil menunjukkan terdapat banyak bentuk bakteri ada yang mengalami elongasi adapula yang patah serta ada yang berukuran tetap.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Terjadi perubahan morfologi *E.coli* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao*) secara *in vitro* yang ditunjukkan dengan adanya pertambahan panjang (elongasi).

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji lanjutan seperti uji secara *in vivo*, uji toksisitas, dan uji klinis agar biji kakao dapat dimanfaatkan secara maksimal.
2. Perlu dilakukan penelitian mengambil beberapa bahan yang terkandung dalam kakao seperti tanin atau katekin untuk diuji secara *in vitro*
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan kebenaran kerusakan peptidoglikan dengan menggunakan TEM.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah, 2004. *Sensitivitas Salmonella typhirium terhadap Ekstrak Daun Psidium guajava L.* Bioscientiae. Vol. 1(1): 31-38.
- Aonuma, S., Arijji, F., Oizumi, K., dan Konno, K. 1987. *Mikroskopi Elektron Pseudomonas aeruginosa Diobati dengan sulbenisilin dan Dibekacin, Tohoku J. exp. Med, 152., 119-128.*
- Badan POM RI. 2005. Pedoman Cara Pembuatan Obat Tradisional yang Baik. Lampiran Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan RI, Nomor: HK.00.05.4.1380.
- Berg, Howard C. 2004. *E. Coli in Motion, Biological and Medical Physics Biomedical Engineering.* New York:Springer Verlag AIP Press.
- Belitz, H. D dan Groch, W. 1999. *Food Chemistry.* New York: Springer-Verlag Berlin.
- Bolton, D.J., Duffy, G., O'Neill, C.J., Baylis, C.L., Tozzoli, R., Morabito S., Wasteson, Y., dan Lofdahl, S. 2009. *Epidemiology and Transmission of Pathogenic Escherichia coli.* Dublin: Ashtown Food Research Center, Cordination Action Food-Ct-2006-036256, Pathogenic Escherichia coli Network.
- Brooks, Geo F., Butel, Janet S., dan Morse, Stephen A. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran, Jawetz, Melnick & Adelberg. Terjemahan Staf Pengajar Mikrobiologi FK Unair dari Medical Microbiology.* Jakarta: EGC.
- Campbell, Neil A., Reece, Jane B., DAN Mitchell, Lawrence G. 2002. *Biologi, Edisi Kelima-Jilid 2.* Jakarta: Erlangga.
- Depkes RI. 2009. *Profil Kesehatan Indonesia 2008.* Jakarta: Departemen Kesehatan R.I.
- Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Barat. 2006. *Informasi Obat Seftriakson.* <http://www.dinkes.jabarprov.go.id/index.php?mod=pubInformasiObat&idMenuKiri=45&idSelected=1&idObat=162&page=7> [20 Mei 2010]

- Fauci, A.S., Kasper, D.L., Longo, D.L., Longo, D.L., Braunwald, E., Hauser, S.L., Jameson, J.L., dan Loscalzo, Joseph. 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine 17th Edition*. USA: McGraw Hill's Access Medicine.
- Forbes, BA, Sahm., DF., dan Weissfeld, AS. 2002. *Bailey & Scott Diagnostik Mikrobiologi edisi ke-11*. St.Louis: Mosby Inc.
- Haryati, Sri. 2005. "Standarisasi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Salah Satu Tahapan Penting dalam Pengembangan Obat Asli Indonesia." Dalam Badan POM RI. *InfoPom Badan Pengawas Obat dan Makanan Indonesia*. Vol. 6, No. 4, Juli 2005.
- Hastuti, Nina. 2010. "Pemanfaatan Ekstrak Polifenol Kulit Buah dan Kulit Biji Kakao Sebagai Senyawa Penghambat Pertumbuhan Bakteri (*Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*)". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember:Jurusan Teknik Hasil Pertanian Fakultas, Teknologi Pertanian Universitas Jember.
- Imam, M. N. 2009. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Bunga Pepaya Jantan (*Carica papaya l*) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Multiresisten Antibiotik*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Jambang, N. 2004. "Study Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan pada 10 Merk Teh Hitam yang Beredar di Pasaran Kota Malang". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya Malang.
- Karlmose, S. 2010. *Susceptibility testing of Enterobacteriaceae using disk diffusion*. Denmark: Departement of Microbiology and Risk Assesment National Food Institute Technical University of Denmark.
- Kattenberg, H.R. 2000. *Nutritional Function of Cocoa and Chocolate*. The Manufacturing Confectioner. Vol. 80 (2):33-37.
- Lerner, K. Lee, dan Lerner, B. W. 2003. *World of Microbiology and Immunology*. United States of America, Farmington Hills: The Gale Group, Inc.
- Misnawi, 2003. *Influence of Cocoa Polyphenols and Enzym Reactivation on The Flavor Development of Unfermented and Underfermented Cocoa Beans*. Thesis. Malaysia: Putra Malaysia University.

- Mufida, D., Suswati, E., dan Shodikin, A. 2006. *Diktat Bakteri Enterobacter*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Ningsih, I. Y., Nuri, P. E., dan Arum, M. 2009. *Buku Petunjuk Praktikum Fitokimia Edisi Revisi IV*. Jember: Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.
- Nirwati, H., Irvati, S., Aria, M., Putu, I.A., Restu, M., dan Rendy, R. 2008. The Use of Bacteriophage Therapy for Curing the *Escherichia coli* O157 Infection in Mice. Departement of Microbiology, Faculty of Medicine Gadjah Mada University, Yogyakarta. *Berkala Ilmu Kedokteran*, Vol. 40, No. 3, September 2008: 119-124.
- Osakabe, N. M., Yamagishi, C., dan Sanboghi. 1998a. *Effects of Polyphenol Substances Derived from Theobroma Cacao on Gastric Mucosal Lesion Induced by Methanol*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. Vol 62 (1): 1535-1538.
- Osakabe, N. M., Yamagishi, C., dan Sanboghi. 1998b. The Antioxidative Substances in Cacao liquor. *Journal of Nutrition Science and and Vitaminology*. Vol. 44 (2): 313-321.
- Osakabe, N. M., Yamagishi, C., dan Natsume. 2000. Antioxidative Polyphenolic Substances in Cacao Liquor. pp. 88-101. In: T.H.Parliament; Chi-tang Ho and P. Schieberle, Caffeinated Beverages; Health Benefits, Physiological Effects and Chemistry, ACS Symposium Series 754.
- Osawa, K., Miyazakil, K. , Shimura, I., Okuda, J., Matsumoto, M and Ooshima, T., 2001, Identification of Cariostatic Substances in the Cacao Bean Husk: Their Antiglucosyltransferase and Antibacterial Activities. *Dent. Res*. Vol. 80 (11):2000-2004.
- Praktiknya, A.W. 2008. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada.
- Refdanita, Maksum, R., Nurgani, A., dan Endang, P. 2004. Pola Kepekaan Kuman terhadap Antibiotik di Ruang Rawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001-2002. *Makara Kesehatan*. Vol. 8(2):41-48.

- Ruzaidi, A., Maleyki, A., Amin, I., Nawalyah, A. G., Muhajir, H., Pauliena, M. B.S.M.J., dan Muskinah, M.S. 2008. Hypoglycaemic Properties of Malaysian Cocoa (*Theobroma cacao*) Polyphenols-Rich Extract. *J. Food Sci.* Vol. 15 (3): 1-8.
- Saeed, S & Tariq, P. 2005. Antibacterial Activities of *Mentha piperita*, *Pisum sativum*, and *Momordica charantia*. *Pak. J. Bot.* Vol. 37 (4): 997-1001.
- Setiadevi, Shinta. 2010. "Karakterisasi Ekstrak Polifenol Biji Kakao Non Fermented dari Berbagai Macam Metode Ekstraksi". Tidak diterbitkan. Skripsi. Jember: Jurusan Teknik Hasil Pertanian, Fakultas Teknik Pertanian Universitas Jember.
- Sinaga, Irma L.H. 2009. "Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Buah Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.)." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Medan: Fakultas Farmasi, Universitas Sumatra Utara.
- Siregar, T. Riyadi, S., Nuraeni, L. 2002. *Pembudidayaan, Pengolahan, Pemasaran Coklat*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Suswati, E., dan Mufida, D., 2009. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Stauth, D. 2007. *Studies for New View on Biology of Flavonoid*. Oregon: Oregon States University. <http://eurakalert.org.htm>. [1 November 2011].
- Sunanto, H. 1992. *Cokelat: Budidaya, Pengolahan Hasil dan Aspek Ekonominya*. Yogyakarta: Kanisius.
- Supriyono, T. 2008. *Kandungan Beta Karoten, Polifenol Total, dan Aktivitas Merantas Radikal Bebas Kefir Susu Kacang Hijau (Vigna Radiate) Oleh Pengaruh Jumlah Starter (Lactobacillus vulgaris dan Candida kefir) Dan Konsentrasi Glukosa*. Tesis. Semarang: Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang.
- Susanti, Ary. 2011. "Daya Antibakteri Ekstrak Etanol daun Beluntas (*Pluchea indica* less) terhadap *Escherichia coli* secara in vitro". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Surabaya: Universitas Airlangga Surabaya.
- Vranes, J., Schonwald, S., Sterk-Kuzmanovic, N., dan Ivancic, B. 2001. Low Virulence Of *Escherichia coli* Strains Causing Exacerbation of Chronic Pyelonephritis. *Acta clin Croat*, 2001; 40: 165-170.

Lampiran A. Mengukur Skala Pada Foto SEM

1. Kontrol positif

Perbesaran pada mikroskop = 3500 x
Foto positif = 2,4 cm = 24 mm
Foto negatif = 1,1 cm
Jadi perubahan perbesaran = $2,4 : 1,1 = 2,1818$
Diketahui $10\mu = 0,01$ mm
Jadi $3500 \times 10\mu = 3500\mu = 35$ mm
Dengan demikian maka $10\mu \approx 35$ mm
Sehingga $35 \times 2,1818 = 76,363$ mm
Jadi $10\mu \approx 76,3636$ mm
 $1\mu \approx 7,6363$ mm
 24 mm $\approx 3,142$ μ m

2. Kontrol Negatif

Perbesaran pada mikroskop = 3500 x
Foto positif = 1,5 cm = 15 mm
Foto negatif = 0,7 cm
Jadi perubahan perbesaran = $1,5 : 0,7 = 2,142$
Diketahui $10\mu = 0,01$ mm
Jadi $3500 \times 10\mu = 3500\mu = 35$ mm
Dengan demikian maka $10\mu \approx 35$ mm
Sehingga $35 \times 2,142 = 74,97$ mm
Jadi $10\mu \approx 74,97$ mm
 $1\mu \approx 7,497$ mm
 15 mm $\approx 2,000\mu$ m

3. Konsentrasi 7,8 mg/ml

Perbesaran pada mikroskop = 3500 x

Foto positif = 3,2 cm = 32 mm

Foto negatif = 1,5 cm

Jadi perubahan perbesaran = $3,2 : 1,5 = 2,133$

Diketahui $10\mu = 0,01$ mm

Jadi $3500 \times 10\mu = 3500\mu = 35$ mm

Dengan demikian maka $10\mu \approx 35$ mm

Sehingga $35 \times 2,133 = 74,655$ mm

Jadi $10\mu \approx 74,655$ mm

$1\mu \approx 7,4655$ mm

32 mm $\approx 4,286\mu$ m

4. Konsentrasi 15,6 mg/ml

Perbesaran pada mikroskop = 3500 x

Foto positif = 5,2 cm = 52 mm

Foto negatif = 2,4 cm

Jadi perubahan perbesaran = $5,2 : 2,4 = 2,166$

Diketahui $10\mu = 0,01$ mm

Jadi $3500 \times 10\mu = 3500\mu = 35$ mm

Dengan demikian maka $10\mu \approx 35$ mm

Sehingga $35 \times 2,166 = 75,81$ mm

Jadi $10\mu \approx 75,81$ mm

$1\mu \approx 7,581$ mm

52 mm $\approx 6,859\mu$ m

5. Konsentrasi 31,25 mg/ml

Perbesaran pada mikroskop = 3500 x

Foto positif = 4 cm = 40 mm

Foto negatif = 2,2 cm
Jadi perubahan perbesaran = $4 : 2,2 = 1,818$
Diketahui $10\mu = 0,01 \text{ mm}$
Jadi $3500 \times 10\mu = 3500\mu = 35 \text{ mm}$
Dengan demikian maka $10\mu \approx 35 \text{ mm}$
Sehingga $35 \times 1,818 = 63,63 \text{ mm}$
Jadi $10\mu \approx 63,63 \text{ mm}$
 $1\mu \approx 6,363 \text{ mm}$
 $40 \text{ mm} \approx 6,286\mu\text{m}$

Lampiran B. Gambar Preparat Bakteri Siap dilihat Pada Mikroskop Elektron

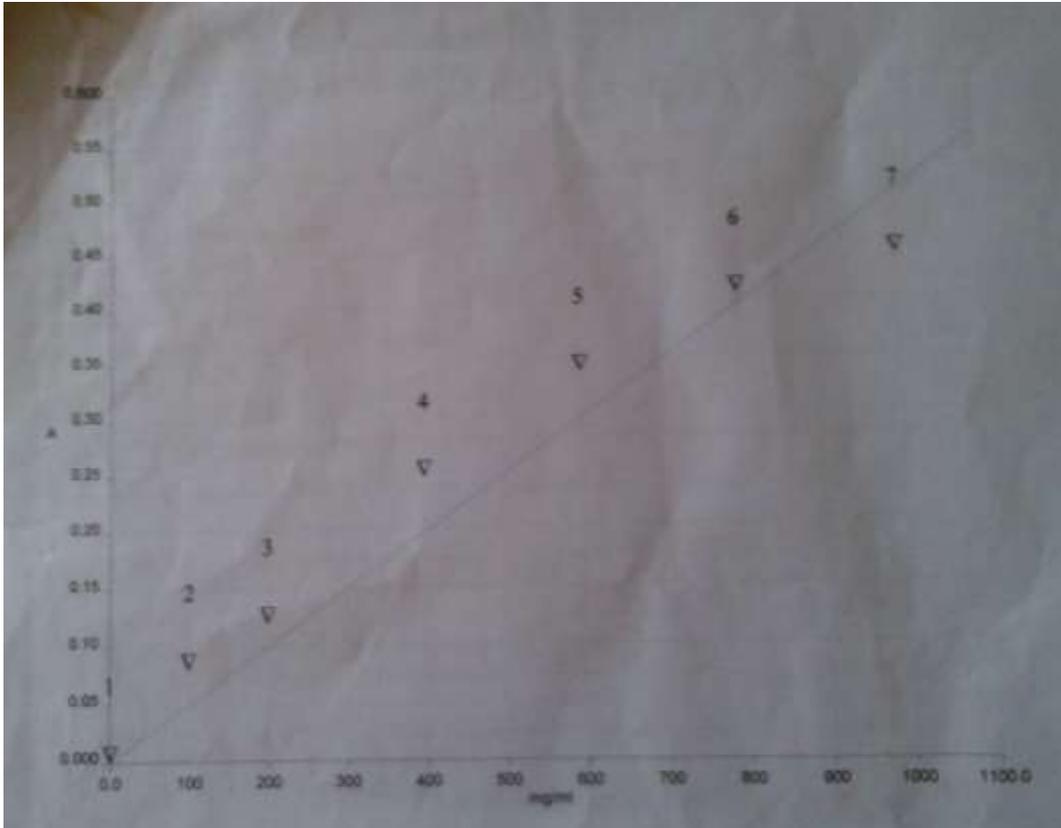


Gambar preparat bakteri yang siap dilihat di mikroskop elektro

Lampiran C. Gambar *Scanning Elektron Mikroskop*



Alat Scanning Elektron Mikroskop

Lampiran D. Calibration Curve

Description : $y = 4.945335e-04 * x$

Lampiran E. Concentration Results

Wavelength	Sample ID	Ordinat	Factor	Concentration	Pengenceran	Berat Contoh	% Polifenol
765.0	Padat 1	0.5361	1	1084	50	0.25	21.68
765.0	Padat 2	0.5469	1	1105.8	50	0.25	22.12