



**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) DALAM MENGHAMBAT  
PERTUMBUHAN *Salmonella typhi*  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

Oleh

**Rovian Cahya Prasetya**

**NIM 132010101049**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2016**



**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) DALAM MENGHAMBAT  
PERTUMBUHAN *Salmonella typhi*  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh  
gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Rovian Cahya Prasetya**

**NIM 132010101049**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

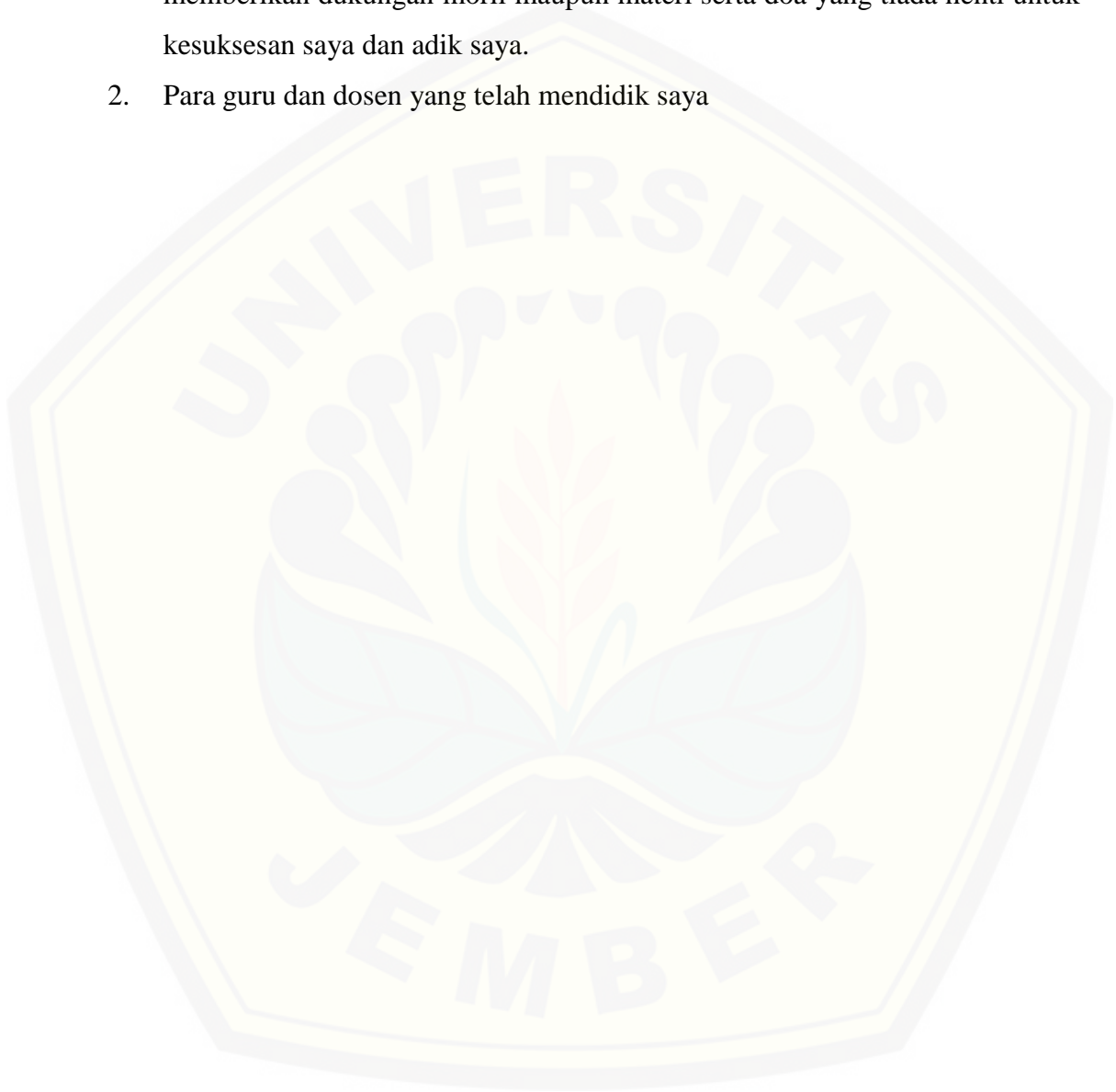
**UNIVERSITAS JEMBER**

**2016**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Bapak saya, Munir Haryanto dan ibu saya, Nani Prabandari, S, Pt yang telah memberikan dukungan moril maupun materi serta doa yang tiada henti untuk kesuksesan saya dan adik saya.
2. Para guru dan dosen yang telah mendidik saya



**MOTO**

Sesungguhnya hidup belum berarti apa pun, selama kita hidup hanya untuk diri kita sendiri.

(Tjiptadinata Effendi)



---

Effendi, Tjiptadinata. 2006. Meraih Sukses dengan Pencerahan Diri. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Rovian Cahya Prasetya

NIM : 132010101049

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Salmonella typhi* secara *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi mana pun , dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung inggi.

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, Desember 2016  
Yang menyatakan

(Rovian Cahya Prasetya)  
NIM 132010101049

**SKRIPSI**

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA  
(*Coffea canephora*) DALAM MENGHAMBAT  
PERTUMBUHAN *Salmonella typhi*  
SECARA *IN VITRO***

Oleh

**Rovian Cahya Prasetya**

**NIM 132010101049**

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : dr. Dini Agustina, M. Biomed

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Jauhar Firdaus

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Salmonella typhi* secara *In Vitro*” telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Selasa, 06 Desember 2016

Tempat : Gedung Keterampilan Klinik Lt. 1 FK UNEJ

Tim Penguji :

Penguji I

dr. M. Ali Shodikin, M. Kes., Sp. A  
NIP 19770625 200501 1 002

Penguji II

dr. Yudha Nurdian, M. Kes  
NIP 19711019 199903 1 001

Penguji III

dr. Dini Agustina M, Biomed  
NIP 19830810 200812 2 003

Penguji IV

dr. Jauhar Firdaus  
NIP 19830125 200812 1 001

Mengesahkan  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea cannephora*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Salmonella typhi* secara *In Vitro***; Rovian Cahya Prasetya, 132010101049; 2016; 82 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Derajat kesehatan masyarakat Indonesia masih tergolong rendah, hal ini dapat dilihat dari prevalensi penyakit menular yang masih tinggi. Salah satunya adalah Demam Tifoid yang disebabkan oleh bakteri *S. typhi*. Prevalensi demam tifoid di Indonesia pada tahun 2007 berjumlah 358 sampai 810 kasus per 100.000, dengan 64% penderita berusia 3 -19 tahun. Di Jember pada tahun 2012 terdapat 15.994 kasus. Pasien dengan diagnosis demam tifoid diberikan terapi dengan menggunakan antibiotik. Antibiotik lini pertama yang diberikan adalah Kloramfenikol. Tingginya penggunaan antibiotik di fasilitas kesehatan memunculkan strain *S. typhi* yang resisten terhadap kloramfenikol, selain itu penggunaan kloramfenikol dalam jangka waktu tertentu dapat menimbulkan efek samping berupa depresi sumsum tulang yang dapat menyebabkan anemia aplastik. Oleh karena itu diperlukan terapi alternatif dengan memanfaatkan bahan alam yang ada, dengan cara mengambil senyawa dalam bahan tersebut yang dapat menghambat atau membunuh bakteri *S. typhi*. Salah satu bahan alam yang bisa digunakan adalah biji kopi robusta (*C. cannephora*).

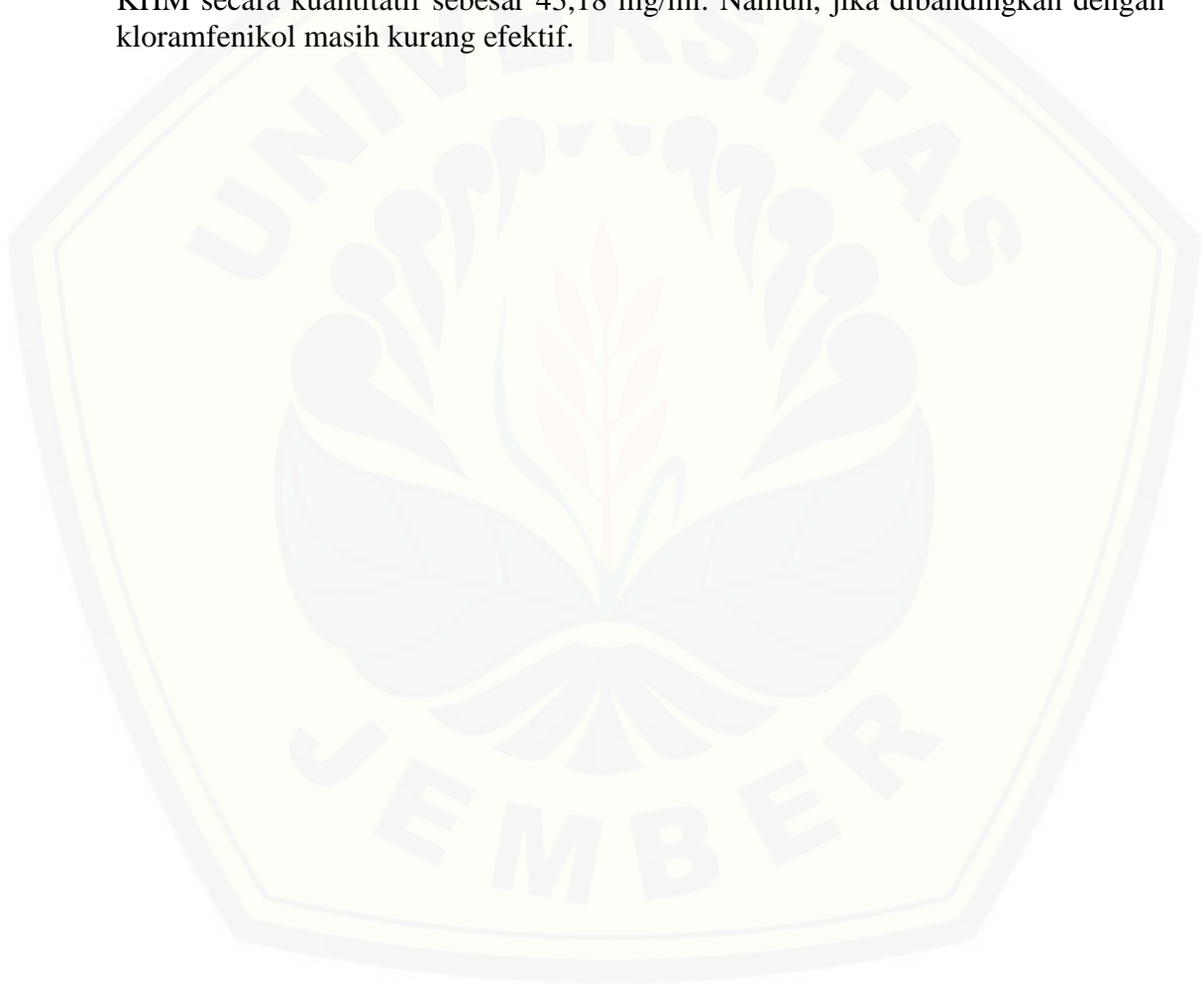
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol biji kopi robusta (*C. cannephora*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro* dan untuk menentukan konsentrasi hambat minimumnya (KHM). Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen semu dengan metode uji *disk diffusion* (*Kirby Bauer*) dengan menggunakan media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Rancangan penelitian berupa *post only control group design* dengan 10 kelompok yang terdiri dari 2 kelompok kontrol (K+ dan K-) dan 8 kelompok perlakuan. Sampel yang digunakan adalah koloni bakteri *S. typhi* yang disesuaikan dengan standar 0,5 *Mc Farland*. Kontrol positif menggunakan suspensi kloramfenikol 3 mg/ml dan kontrol negatif menggunakan aquades steril. Sedangkan kelompok perlakuan 1 (P1) - P8 menggunakan ekstrak etanol biji kopi robusta dengan konsentrasi 500; 400; 300; 200; 100; 75; 50; dan 25 mg/ml.

Data yang diperoleh berupa diameter zona hambat di sekitar kertas cakram pada media MHA yang telah dikultur dengan *S. typhi*. Kemudian data dianalisis secara deskriptif dan statistik. Analisis statistik menggunakan uji normalitas *Shapiro Wilk*, selanjutnya diuji dengan uji korelasi sederhana bivariat (Uji *Spearman*) untuk mengetahui apakah ada hubungan antara variabel bebas (konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta) dengan variabel terikat (diameter zona hambat). Uji regresi linier dilakukan untuk mengetahui pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat. Setelah itu, dilakukan uji homogenitas untuk melihat varian data homogen atau tidak, dan dilanjutkan uji komparasi dengan *Kruskal Wallis* (data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen). Untuk



mengetahui adanya perbedaan pada masing-masing konsentrasi terhadap konsentrasi yang lain dilakukan uji *Post Hoc multiple comparisons* dengan uji *Mann-Whitney*.

Hasil penelitian didapatkan bahwa, terdapat efek antibakteri pada ekstrak etanol biji kopi robusta terhadap bakteri *S. typhi* secara *in vitro*. Efek antibakteri tersebut ditunjukkan dengan adanya diameter zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram, dan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta, diameter zona hambat yang terbentuk semakin lebar, hal ini dikarenakan pada biji kopi robusta terdapat beberapa senyawa antibakteri seperti asam klorogenik, trigonelin dan kafein. Nilai KHM ekstrak etanol biji kopi robusta terhadap bakteri *S. typhi* secara kualitatif adalah pada konsentrasi 25 mg/ml dan KHM secara kuantitatif sebesar 43,18 mg/ml. Namun, jika dibandingkan dengan kloramfenikol masih kurang efektif.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Salmonella typhi* secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyelesaikan 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. Dini Agustina, M. Biomed, dan dr. Jauhar Firdaus selaku Dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatiannya dalam penulisan tugas akhir ini;
3. dr. Muhammad Ali Shodikin, M. Kes, Sp. A dan dr. Yudha Nurdian, M. Kes, selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktunya untuk menguji penulis;
4. dr. Al-Munawir, M. Kes, Ph. D selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama studi;
5. dr. Ancah Caesarina Novi M, Ph. D selaku koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
6. orang tua tercinta, Munir Haryanto dan Nani Prabandari S, Pt. yang senantiasa memberikan dukugan moral maupun materi, dan kasih sayang dan kesabaran yang tiada batas untuk penulis;
7. adik tersayang, Rizky Bagas Permana, penyemangat penulis untuk terus menjadi sosok kakak dan panutan yang baik;
8. citra Putri Anandira, yang telah banyak membantu, memberikan dukungan, motivasi dan doa kepada penulis;

9. teman-teman FK UNEJ 2013, yang selalu memberi semangat dan informasi mengenai tatacara penulisan KTI dan sistematika Tugas Akhir;
10. teman seperjuangan Tim Mikrobiologi, terimakasih atas kerjasamanya
11. teknisi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Mbak Lilis. Terimakasih atas bantuan dan kerjasama, dukungan serta masukan selama penelitian skripsi ini

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

Jember, Desember 2016

Rovian Cahya Prasetya

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN BIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 <i>Salmonella typhi</i></b> .....	4
2.1.1 Epidemiologi Demam tifoid .....	4
2.1.2 Taksonomi <i>S. typhi</i> .....	6
2.1.3 Morfologi <i>S. typhi</i> .....	6
2.1.4 Sifat Pertumbuhan <i>S. typhi</i> .....	7
2.1.5 Patogenisitas <i>S. typhi</i> .....	7
2.1.6 Struktur Antigen <i>S. typhi</i> .....	8
<b>2.2 Kloramfenikol</b> .....	9
2.2.1 Farmakodinamik Kloramfenikol .....	9
2.2.2 Farmakokinetik Kloramfenikol .....	10
2.2.3 Efek Samping Kloramfenikol .....	10

2.2.4 Mekanisme Resistensi Kloramfenikol .....	11
<b>2.3 Resistensi Antimikroba .....</b>	<b>11</b>
2.3.1 Asal Resistensi .....	12
2.3.2 Faktor yang Memudahkan Timbulnya Resistensi .....	13
<b>2.4 Kopi (<i>Coffea sp.</i>) .....</b>	<b>13</b>
2.4.1 Taksonomi Kopi Robusta .....	14
2.4.2 Habitat Kopi Robusta .....	14
2.4.3 Deskripsi Botani Kopi Robusta .....	15
2.4.4 Kandungan Kopi Robusta .....	16
<b>2.5 Uji Antimikroba .....</b>	<b>19</b>
2.5.1 Metode Difusi (Tes Kirby & Bauer) .....	20
2.5.2 Metode Dilusi .....	20
<b>2.6 Kerangka Konsep Penelitian .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Hipotesis .....</b>	<b>22</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Jenis Penelitian .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Rancangan Penelitian .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Sampel <i>S. typhi</i> .....</b>	<b>24</b>
3.3.1 Ukuran Sampel ( <i>Sampel Size</i> ) .....	24
<b>3.4 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>25</b>
3.4.1 Tempat Penelitian .....	25
3.4.2 Waktu penelitian .....	25
<b>3.5 Variabel Penelitian .....</b>	<b>25</b>
3.5.1 Variabel Bebas .....	25
3.5.2 Variabel Terikat .....	25
3.5.3 Variabel Tekendali .....	26
<b>3.6 Definisi Operasional .....</b>	<b>26</b>
<b>3.7 Alat dan Bahan .....</b>	<b>26</b>
3.7.1 Alat Penelitian .....	26
3.7.2 Bahan Penelitian .....	26
<b>3.8 Prosedur Penelitian .....</b>	<b>27</b>

3.8.1 Tahap Persiapan .....	27
3.8.2 Tahap Perlakuan .....	29
3.8.3 Tahap Pengukuran Zona Hambat .....	30
<b>3.9 Analisis Data .....</b>	<b>30</b>
<b>3.10 Alur Penelitian .....</b>	<b>31</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	32
4.2 Analisis Data .....	35
4.3 Pembahasan .....	39
<b>BAB. 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>44</b>
5.1 Kesimpulan .....	44
5.2 Saran .....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>50</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Taksonomi <i>S. typhi</i> .....	6
2.2 Taksonomi kopi robusta .....	14
2.3 Kandungan senyawa dalam biji kopi robusta .....	17
4.1 Hasil ekstraksi biji kopi robusta .....	32
4.2 Hasil pengukuran diameter zona hambat daya penghambatan oleh berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta ( <i>C. canephora</i> ) terhadap pertumbuhan <i>S. typhi</i> .....	33
4.3 Hasil uji <i>Post Hoc multiple comparisons</i> uji <i>Mann-Whitney</i> .....	38

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Peta penyebaran <i>S. typhi</i> di dunia.....	5
2.2 Morfologi <i>S. typhi</i> dengan pewarnaan Gram.....	6
2.3 Tanaman kopi .....	15
2.4 Buah dan biji kopi.....	16
2.5 Skema kerangka konsep .....	21
3.1 Skema rancangan penelitian .....	24
3.2 Alur penelitian .....	31
4.1 Zona hambat berbagai tingkat konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta .....	33
4.2 Grafik pengaruh ekstrak etanol biji kopi robusta terhadap diameter zona hambat pertumbuhan <i>S. typhi</i> .....	34
4.3 Hasil uji kontrol positif dan kontrol negatif .....	35
4.4 Grafik persamaan garis linier konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta terhadap diameter zona hambat pertumbuhan <i>S. typhi</i> .....	36



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
3.1 Skema pengenceran ekstrak etanol biji kopi robusta.....	50
3.2 Skema pengenceran antibiotik kloramfenikol .....	51
4.1 Persetujuan etik penelitian.....	52
4.2 Hasil pengulangan 2, 3 dan 4.....	53
4.3 Uji Normalitas <i>Shapiro Wilk</i> .....	54
4.4 Uji Korelasi Bivariat (Uji <i>Speraman</i> ).....	56
4.5 Uji Regresi Linier Sederhana .....	57
4.6 Uji Homogenitas ( <i>Levane Test</i> ).....	58
4.7 Analisis Komparasi (Uji Non-Parametrik <i>Kruskal Wallis</i> ).....	59
4.8 <i>Post Hoc Test</i> (Uji <i>Mann-Whitney</i> ) .....	60

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tingginya kasus demam tifoid di Indonesia, khususnya di kabupaten Jember dan tingginya kejadian resistensi obat yang digunakan untuk terapi demam tifoid. Peneliti mencoba mencari alternatif terapi yang bisa digunakan dengan memanfaatkan bahan alam yang melimpah di Kabupaten Jember, beberapa di antaranya adalah kopi, kakao, teh dan tembakau. Peneliti memutuskan memilih menggunakan kopi karena belum ada penelitiannya. Beberapa fakta yang mendukung terwujudnya penelitian ini terurai dalam paragraf selanjutnya.

Lingkungan merupakan salah satu variabel yang digunakan untuk menilai baik buruknya derajat kesehatan masyarakat (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2016). Derajat kesehatan masyarakat di Indonesia tergolong rendah, hal ini dapat dilihat prevalensi penyakit menular masih tinggi (Widodo, 2014). Salah satu penyakit menular tersebut adalah demam tifoid yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif *Salmonella typhi*. Menurut WHO pada tahun 2014 diperkirakan terdapat 16 juta kasus penyakit demam tifoid per tahun dan 600 ribu diantaranya berujung pada kematian. Sekitar 70% dari seluruh kasus kematian terjadi di benua Asia (Herliani *et al.*, 2015). Sedangkan di Indonesia pada tahun 2007 kasus demam tifoid berjumlah 358 sampai 810 per 100.000 dengan 64% penderita berusia 3 – 19 tahun (Anggeraini, 2013) dan di Jember menurut Dinas Kesehatan Kabupaten Jember kasus demam tifoid dari bulan Januari hingga Desember 2012 berjumlah 15.994 kasus (Hafi, 2014).

Pasien dengan diagnosis pasti demam tifoid dapat diberikan terapi antibiotik berupa kloramfenikol, yang merupakan antibiotik lini pertama untuk terapi demam tifoid. Lini kedua dapat diberikan ampisilin, kotrimoksazol, atau seftriakson (Ratnasari *et al.*, 2015). Kloramfenikol dijadikan lini pertama dikarenakan efektif, mudah didapat, murah dan dapat diberikan secara oral, namun penggunaan kloramfenikol dalam jangka waktu tertentu dapat menimbulkan efek samping berupa depresi sumsum tulang yang dapat menyebabkan anemia aplastik (Rampengan, 2013). Terapi alternatif untuk

demam tifoid apabila pasien sudah resisten terhadap antibiotik di atas dapat diberi antibiotik dari golongan kuinolon seperti siprofloksasin, oflosaksin, dan perflosaksin. Namun golongan ini dapat mengakibatkan gangguan pertumbuhan dan kerusakan sendi apabila diberikan pada anak-anak (Nelwan, 2012). Tingginya penggunaan antibiotik pada kasus demam tifoid di fasilitas kesehatan membuat bakteri *S. typhi* sudah banyak yang resisten, dikenal dengan istilah *multidrug resistance Salmonella typhi* (MDRST) (Rampangan, 2013).

Apabila sudah terjadi resistensi dapat dicegah dengan cara kadar antibiotik yang diberikan harus dipertahankan pada kadar yang cukup tinggi, pemberian sekaligus dua obat yang tidak memberikan resistensi silang atau dengan membatasi penggunaannya, terutama di rumah sakit (Jawetz *et al.*, 2013). Alternatif lain dengan memanfaatkan bahan alami yang ada dengan mengambil senyawa antibakteri dalam bahan tersebut. Sehingga dapat digunakan menghambat atau membunuh bakteri.

Salah satu bahan alam yang mungkin bisa digunakan adalah kopi. Bagian kopi yang bisa digunakan sebagai bahan antibakteri adalah bagian bijinya, karena mengandung senyawa *nonvolatile* seperti, asam klorogenik, trigonelin, dan kafein (Bharath *et al.*, 2015). Kandungan senyawa tersebut pada kopi robusta baik kopi robusta yang masih hijau ataupun yang sudah mengalami proses pembakaran konsentrasinya lebih tinggi dibanding kopi arabika (Farah, 2012). Beberapa penelitian membuktikan bahwa biji kopi robusta memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri di mulut dan gigi, antara lain *Streptococcus parasanguinis* dan *Lactobacillus rhamnosus* (Silva *et al.*, 2015). Selain itu, biji kopi robusta juga mempunyai kemampuan melawan *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap metisilin (Kenisa *et al.*, 2012). Kopi robusta merupakan jenis kopi yang banyak di tanam, yaitu sekitar 95% (Raharjo, 2012) di daerah pulau Jawa, Sumatra dan Sulawesi (Kenisa *et al.*, 2012). Di wilayah Jawa Timur, Kabupaten Jember mempunyai luas lahan perkebunan kopi robusta terbesar nomor dua setelah Malang dengan produksi 2.561 ton di tahun 2013 (Direktorat Jendral Perkebunan, 2014).

Berdasarkan opini dan beberapa fakta di atas peneliti ingin mengetahui lebih lanjut tentang efek ekstrak biji kopi robusta terhadap pertumbuhan *S. typhi* secara *in vitro*. Dengan harapan ekstrak biji kopi robusta mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi*. Dan hasil dari penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk penelitian selanjutnya untuk memaksimalkan ekstrak biji kopi robusta.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut. Pertama, apakah ekstrak etanol biji kopi robusta dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*? Kedua, berapakah konsentrasi hambat minimal ekstrak biji kopi robusta yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini, adalah sebagai berikut. Pertama, peneliti ingin mengetahui aktivitas ekstrak etanol biji kopi robusta dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*. Kedua, peneliti ingin mengetahui konsentrasi hambat minimal ekstrak biji kopi robusta yang masih dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini, adalah sebagai berikut. Dapat Memberikan pengetahuan tambahan mengenai efek ekstrak etanol biji kopi robusta dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi*. Serta, Dapat dijadikan dasar untuk penelitian selanjutnya secara *in vivo*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Salmonella typhi*

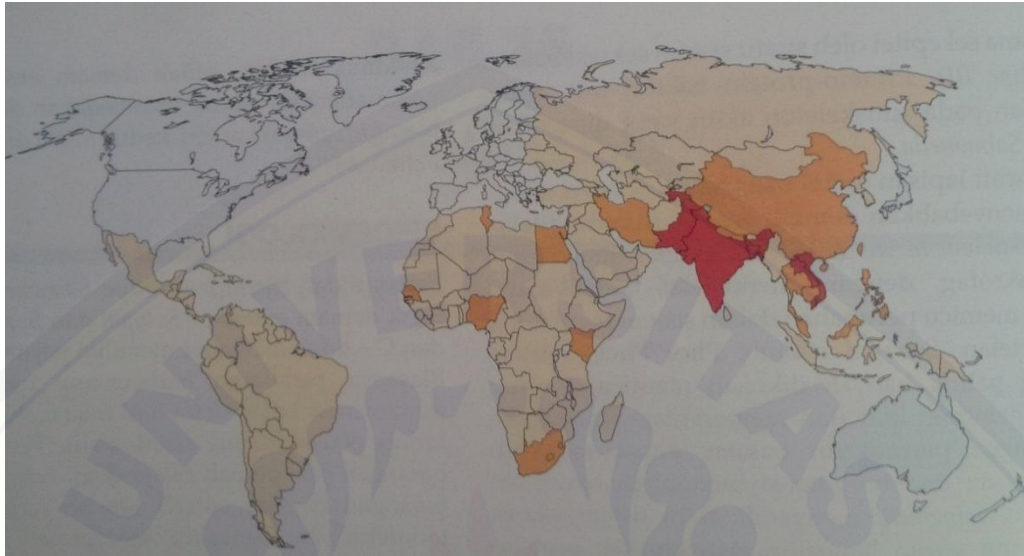
*Salmonella typhi* merupakan organisme anggota famili *enterobacteriaceae*. Sebutan lain *S. typhi* adalah *S. choleraesuis serevor typhi*, *S. sherevor typhi*, *S. entericaserovar typhi* (Darmawati, 2009). Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi gastroenteritis, mulai dari yang ringan sampai dengan demam tifoid yang berat disertai dengan bakterimia (Jawetz *et al.*, 2013).

#### 2.1.1 Epidemiologi Demam Tifoid

Insidensi demam tifoid masih tergolong tinggi, namun komplikasi yang ditimbulkan dan angka kematian sudah menurun dengan upaya diagnosis yang cepat dan pemberian antibiotik yang tepat (Rampengan, 2013). Menurut WHO pada tahun 2014 diperkirakan terdapat 16 juta kasus demam tifoid per tahun dan 600 ribu diantaranya berujung pada kematian. Sekitar 70% dari seluruh kasus kematian terjadi di benua Asia (Herliani *et al.*, 2015). Asia Tenggara dan Selatan-Tengah merupakan bagian yang memiliki insidensi paling tinggi (Longo dan Fauci, 2013). Sedangkan di Indonesia pada tahun 2007 kasus demam tifoid berjumlah 258 sampai 810 per 100.000 dengan 64% penderita berumur 9 – 13 tahun (Anggeraini 2013), dan di Jember menurut Dinas Kesehatan Kabupaten Jember kasus demam tifoid dari bulan Januari hingga Desember 2012 berjumlah 15.994 kasus (Hafi, 2014). Tingginya insidensi demam tifoid, dikarenakan penyebaran bakteri *S. typhi* hampir menyeluruh di dunia, dan sebagian besar menjadi penyakit endemik (Gambar 2.1).

Insiden demam tifoid yang masih tinggi berkaitan dengan sanitasi yang buruk dan tidak adanya akses ke air minum bersih, sehingga di daerah perkotaan yang padat penduduk dan kasus demam tifoid lebih tinggi jika dibandingkan dengan pedesaan. Faktor risiko lain yang menyebabkan kasus demam tifoid tinggi adalah air/ es yang tercemar, banjir, makanan/ minuman yang dibeli dari pedagang di pinggir jalan, buah/ sayuran mentah yang ditanam di kebun yang disiram dengan air selokan, orang serumah yang sakit, tidak mencuci tangan dan tidak

adanya akses ke toilet (Longo dan Fauci, 2013). Selain itu, dikarenakan status imun pejamu yang buruk, jumlah bakteri yang masuk dan virulensi bakteri (Widodo, 2014).



Keterangan :

- : Laporan adanya galur resisten asam nalidiksat
- : Laporan adanya galur resisten multi-obat
- : Penyakit endemic

Gambar 2.1 Peta penyebaran *S. typhi* di dunia (Longo dan Fauci, 2013)

### 2.1.2 Taksonomi *S. typhi*

Taksonomi *S. typhi* berdasarkan penggolongan dan tata nama adalah sebagai berikut (Tabel 2.1). Satu famili dengan bakteri *Eschericia coli*, *Klebsiella sp.*, *Proteus sp.* dan *Shigella sp.* Untuk membedakan tiap genus dari famili *enterobacteriaceae* adalah dengan kultur pada medium selektif untuk masing-masing genus (Jawetz *et al.*, 2013)

Tabel 2.1 Taksonomi *S. typhi*

Tingkatan	
Kingdom	Bacteriae
Filum	Proteobacteriae
Kelas	Gamma proteobacteriae
Ordo	Enterobacteriales
Famili	Enterobactericeae
Ganus	<i>Salmonella</i>
Spesies	<i>S. typhi</i>

Sumber : Todar, 2008

### 2.1.3 Morfologi *S. typhi*

*Salmonella typhi* berbentuk batang, tidak berspora, bergeral dengan flagel pediatrik dan mempunyai ukuran 1-3,5 um x 0,5-0,8 um. Jika membentuk koloni, ukurannya dapat mencapai 2-4 mm (Gambar 2.2) (Jawetz *et al.*, 2013). Bakteri ini bersifat Gram-negatif sehingga lapisan luarnya terusun dari lipopolisakarida dan dapat berfungsi sebagai endotoksin (Darwati, 2009).



Gambar 2.2 Morfologi *S. typhi* dengan pewarnaan Gram (Todar, 2008)

#### 2.1.4 Sifat Pertumbuhan *S. typhi*

Bakteri *S. typhi* dapat tumbuh pada suasana fakultatif anaerob, pada pH pertumbuhan 6-8 dengan suhu 15-41<sup>0</sup>C (suhu pertumbuhan optimum 37,5<sup>0</sup>C). Dapat memfermentasikan manitol dan sorbitol, tidak membentuk gas, katalase positif, oksidase negatif, tidak memproduksi indol karena tidak menghasilkan enzim *tryptophanase*, *methyl red* positif menunjukkan bahwa fermentasi glukosa menghasilkan asam. *Voges-prokauer* negatif, citrat negatif, menghasilkan H<sub>2</sub>S pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), yang selanjutnya akan bereaksi dengan Fe dalam media yang kemudian berubah menjadi senyawa FeS yang tampak warna hitam pada media (Darwati, 2009). Pada media agar SS, EMB, dan *MacConcay* koloni *S. typhi* berbentuk bulat, kecil dan tidak berwarna dan pada media agar *Wilson Blair* koloninya berwarna hitam (Jawetz *et al.*, 2013).

#### 2.1.5 Patogenisitas *S. typhi*

Patogenisitas *S. typhi* sangat bergantung pada sejumlah faktor virulensi, seperti kemampuan untuk adhesi pada sel pejamu, flagella, enzim, toksin, faktor bioaktif. Faktor bioaktif akan memfasilitasi bakteri untuk melekat pada mukosa usus halus, invasi, multiplikasi dan menyebar masuk ke jaringan limfoid sampai aliran darah dan beredar ke seluruh tubuh sampai pada hati, sumsum tulang, limfe, kandung empedu dan *peyer's patch*. Sehingga dapat memunculkan gejala klinis (Jindal *et al.*, 2012).

Bakteri *S. typhi* masuk ke dalam saluran cerna bersama makanan/minuman. Ketika melewati lambung sebagian bakteri akan mati, namun jika kondisi lambung abnormal, yaitu dalam kondisi pH lambung naik (basa) dan jumlah bakteri yang masuk banyak, maka sebagian bakteri akan lolos dari pertahanan lambung dan masuk ke usus halus. Di dalam usus halus bakteri akan berkembang biak dan mulai menginvasi mukosa usus halus, apabila respon imun humoral usus halus tidak adekuat. Bakteri yang berhasil menginvasi mukosa akan difagosit oleh sel-sel makrofag dan di bawa ke *payer patch* di ileum distal. Namun bakteri mampu berkembang biak di dalam makrofag, sehingga bakteri dapat



masuk ke aliran kelenjar limfe dan bahkan ke sirkulasi sistemik sehingga menyebabkan bakterimia (Soedarmo *et al.*, 2015). Dosis infeksi rata-rata untuk menimbulkan infeksi klinis dan subklinis pada manusia adalah  $10^3 - 10^8$  kuman *S. typhi* (Jawetz *et al.*, 2013).

Gambaran klinis akibat infeksi bakteri *S. typhi* sangat bervariasi dari gejala klinis yang ringan dan tidak memerlukan perawatan khusus sampai berat sehingga harus di rawat. Variasi gejala ini disebabkan oleh faktor galur *Salmonella*, status nutrisi dan imun pejamu serta lamanya sakit dirumah (Soedarmo *et al.*, 2015). Masa tunas demam tifoid berlangsung antara 10-14 hari. Pada minggu pertama keluhan dan gejala yang timbul serupa dengan penyakit infeksi akut pada umumnya yaitu demam, sifat demam adalah meningkat perlahan-lahan terutama pada sore dan malam hari, selain itu nyeri kepala, pusing, nyeri otot, anoreksia, mual, muntah, obstipasi atau diare, perasaan tidak enak di perut, batuk dan epistaksis juga dapat ditemukan. Pada pemeriksaan fisik hanya di dapat suhu badan yang meningkat. Dalam minggu kedua gejala menjadi lebih jelas berupa demam, bradikardi relatif, lidah yang berselaput, hepatomegali, splenomegali, meteorismus, gangguan mental dapat terjadi berupa somnolen, stupor, koma, delirium, atau psikosis (Widodo, 2009). Berdasarkan penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Pendidikan Dokter Universitas Kathmandu, India gejala klinis yang menyertai demam tifoid berupa demam (100%), sakit kepala (82,6%), muntah (21,7%), diare (28,3%), hepatomegali (18,1%) dan splenomegali (28,3%) (Ratnasari *et al.*, 2015).

#### 2.1.6 Struktur Antigen *S. typhi*

Antigen somatik pada *Salmonella* serupa dengan antigen somatik (O) kuman *Enterobacteriaceae* lainnya. Antigen ini tahan terhadap pemanasan hingga  $100^{\circ}\text{C}$ , alkohol dan asam. Antibodi utama yang terbentuk dari aktivitas antigen ini adalah IgM. Antigen kedua yaitu antigen flagel (H), rusak pada pemanasan di atas  $60^{\circ}\text{C}$ , alkohol dan asam. Antibodi yang terbentuk dari antigen flagel (H) ialah IgG (Jawetz *et al.*, 2013).

Antigen Vi, adalah polimer dari polisakarida yang bersifat asam, terdapat pada bagian paling luar dari badan kuman. Pada pemanasan 60°C selama 1 jam, antigen ini dapat rusak. Kuman dengan antigen Vi lebih virulen baik terhadap binatang maupun manusia, antigen Vi juga menentukan kepekaan kuman terhadap bakteriofaga dan dalam laboratorium sangat berguna untuk diagnosis cepat kuman *S. typhi* yaitu dengan *agglutination slide test* dengan Vi antiserum (Jawetz *et al.*, 2013).

## 2.2 Kloramfenikol

Kloramfenikol merupakan antibiotik berbentuk kristal putih yang tidak larut dalam air dan mempunyai rasa yang pahit dengan rumus kimia ( $R = -NO_2$ ). salah satu antibiotik yang dihasilkan dari biakan *Streptomyces venezuelae*, isolasi pertama pada tahun 1947. Namun kloramfenikol saat ini sudah dapat dibuat secara sintesis (Syarif *et al.*, 2012). Kloramfenikol dijadikan lini pertama untuk terapi demam tifoid dikarenakan efektif, mudah didapat, murah, dan dapat diberikan per oral (Rampengan, 2013).

### 2.2.1 Farmakodinamik Kloramfenikol

Bekerja sebagai inhibitor sintesis protein, dengan cara menghambat perlekatan asam amino ke rantai peptida yang baru secara reversibel pada unit 50S ribosom dengan mengganggu kerja enzim peptidil tranferase, enzim ini berfungsi membentuk ikatan peptida antara asam amino baru yang masih melekat pada tRNA dengan asam amino terakhir yang sedang berkembang (Pratiwi, 2008). Bersifat bakteriostatik dan spektrum yang luas, namun dapat bersifat bakterisid terhadap *H. influenza*, *Neisseria meningitidis*, dan *S. pneumonia*. Sedangkan untuk golongan *Enterobacteriaceae* memiliki sensitivitas yang berbeda-beda terhadap kloramfenikol, untuk Galur umum *Shigella* dan *Salmonella* sebagian besar sudah resisten terhadap kloramfenikol. Resistensi terhadap kloramfenikol biasanya disebabkan oleh asetiltranferase terkode plasmid yang menginaktivasi obat dengan mencegah ikatannya pada ribosom bakteri, selain itu dengan penurunan atau mutasi ribosom (Gilman, 2007).

### 2.2.2 Farmakokinetik Kloramfenikol

Penyerapan kloramfenikol terjadi cepat setelah pemberian lewat oral. Di dalam darah berikatan dengan albumin dan terdistribusi dengan baik ke berbagai jaringan seperti otak, otot dan mata. Kadar puncak dalam darah tercapai setelah 2 jam pemberian. Di dalam hati mengalami konjugasi dengan asam glukuronat oleh enzim glukoronil transferase.

Masa paruh pada orang dewasa kurang lebih 3 jam dan pada bayi berumur 2 minggu kurang lebih 24 jam. Sekitar 80-90% dalam waktu 24 jam kloramfenikol yang diberikan lewat oral akan diekskresikan seluruhnya lewat ginjal, dan hanya 5-10% yang diekskresikan melalui urin dalam bentuk aktif, sisanya dalam bentuk glukuronat atau hidrolisat lain yang tidak aktif (Syarif *et al.*, 2012). Dalam penggunaannya sebagai terapi demam tifoid kloramfenikol umumnya memberikan perbaikan klinis dalam waktu 72 jam dan suhu tubuh akan kembali normal dalam waktu 7-14 hari (Rampengan, 2013).

### 2.2.3 Efek Samping Kloramfenikol

Efek samping kloramfenikol bagi pasien yang intoleran atau penggunaan dalam jangka panjang antara lain.

#### a. Reaksi Hematologik

Beberapa reaksi hematologik yang terjadi karena penggunaan kloramfenikol adalah 1) depresi sumbu tulang 2) kelainan darah berupa anemia aplastik dengan pansitopenia yang ireversibel, retikulositopenia, peningkatan serum *iron* dan *iron binding capacity* serta vakuolisasi seri eritrosit bentuk muda, 3) dapat menyebabkan hemolisis pada pasien dengan defisiensi G<sub>6</sub>PD bentuk mediteranian.

Kelainan tersebut dapat dihindari melalui hitung sel darah yang dilakukan secara periodik yang dapat memberikan gambaran untuk mengurangi dosis atau menghentikan terapi (Syarif *et al.*, 2012).

b. Saluran Cerna

Manifestasinya dalam bentuk mual, muntah, glossitis, diare dan enterokolitis (Syarif *et al.*, 2012).

c. Sindrom GRAY

Terjadi pada neonatus terutama pada bayi prematur yang mendapat terapi kloramfenikol 200mg/kg BB dapat menimbulkan sindrom Gray, timbul antara hari ke 2 sampai 9 masa terapi, rata-rata pada hari ke 4. Hal ini dikarenakan sistem konjugasi oleh enzim glukuronil transferase belum sempurna dan kloramfenikol yang tidak terkonjugasi belum dapat diekskresikan dengan baik melalui ginjal (Syarif *et al.*, 2012).

#### 2.2.4 Mekanisme Resistensi Kloramfenikol

Terjadinya resistensi pada kloramfenikol akibat adanya asetil transferase yang diperantarai oleh faktor R yang dapat menyebabkan inaktivasi obat. Beberapa strain *Serratia*, *Providencia*, *P. aeruginosa* dan *S. typhi* sudah banyak yang telah resisten (Syarif *et al.*, 2012). Telah dilaporkan juga bahwa kasus demam tifoid berat atau bahkan fatal pada anak disebabkan oleh adanya resistensi obat ganda atau disebut *multi drug resisten* (MDR) terhadap *S. typhi* (Rampengan, 2013).

### 2.3 Resistensi Antimikroba

Mikroorganisme dapat menjadi resisten terhadap antimikroba tertentu melalui berbagai mekanisme, antara lain.

- a. Mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat menghancurkan zat aktif obat
- b. Mikroorganisme mengubah permeabilitas terhadap obat.
- c. Mikroorganisme menyebabkan perubahan target struktural untuk obat.
- d. Mikroorganisme menyebabkan perubahan jalur metabolik yang melintasi reaksi yang dihambat oleh obat.

- e. Mikroorganisme menyebabkan perubahan pada enzim yang masih dapat melakukan fungsi metabolik tetapi kurang dipengaruhi oleh obat (Jawetz *et al.*, 2013).

### 2.3.1 Asal Resistensi

Berdasarkan asal terjadinya resistensi dapat dibagi menjadi 2 sebab, yaitu.

#### a. Asal resistensi obat nongenetik

Resistensi obat nongenetik dapat terjadi melalui 3 cara. 1) Antimikroba akan berkerja efektif dan tidak mudah resistensi jika mikroorganisme sasarannya melakukan pembelahan secara aktif, jika mikroorganisme secara metabolik tidak aktif (tidak memperbanyak diri) dapat resisten terhadap obat secara fenotip. Namun, keturunannya sangat rentan terhadap obat 2) Mikroorganisme dapat kehilangan struktur target spesifik untuk suatu obat selama beberapa generasi sehingga menjadi resisten. 3) Mikroorganisme dapat menginfeksi pejamu di tempat kerja antimikroba yang tidak aktif atau ditiadakan (Jawetz *et al.*, 2013).

#### b. Asal resistensi obat secara genetik

Pada umumnya obat-obatan antimikroba menjadi resisten terhadap mikroorganisme karena adanya proses seleksi yang menyebabkan perubahan susunan genetik. Macam-macam resistensi obat secara genetic adalah sebagai berikut.

##### 1) Resistensi kromosom

Resistensi ini muncul sebagai akibat dari adanya mutasi spontan pada lokus yang mengontrol kerentanan terhadap obat antimikroba tertentu. Obat antimikroba dapat berberan sebagi penyeleksi untuk menekan organisme yang rentan, namun bagi organisme mutan, justru mempermudah pertumbuhannya. Mutasi spontan terjadi dengan frekuensi  $10^{-12}$  sampai  $10^{-17}$ , sehingga jarang menjadi penyebab timbulnya resistensi obat, tetapi untuk obat-obat tertentu seperti rifampisin dan streptomisin frekuensi terjadinya lebih besar.

## 2) Resistensi Ekstrakromosom

Resistensi ini dapat terjadi pada bakteri yang mempunyai plasmid. Beberapa plasmid membawa gen yang menyebabkan resistensi terhadap beberapa obat-obatan antimikroba. Gen plasmid untuk resistensi antimikroba sering mengontrol pembentukan enzim yang mampu menghancurkan obat-obatan antimikroba (Jawetz *et al.*, 2013).

### 2.3.2 Faktor yang Memudahkan Timbulnya Resistensi

Beberapa faktor yang memudahkan timbulnya resistensi antara lain.

- a. Seringnya penggunaan antimikroba di pelayanan kesehatan yang tidak rasional.
- b. Penggunaan antimikroba baru yang penggunaannya berlebihan
- c. Penggunaan antimikroba dalam jangka waktu yang lama
- d. Faktor lain yang mendukung timbulnya resistensi, seperti kemudahan transportasi modern, perilaku seksual, dan sanitasi yang buruk (Syarif *et al.*, 2012).

## 2.4 Kopi (*Coffea sp.*)

Kopi sudah sejak lama di kenal masyarakat, baik di dalam maupun luar negeri. Kopi masuk ke Indonesia pada abad ke-17 dibawa oleh bangsa Belanda yang pada saat itu sedang mengembangkan tanaman kopi di Jakarta, dan kemudian meluas hampir ke seluruh wilayah di Indonesia. Karena dukungan iklim yang sesuai, yaitu iklim tropis untuk pertumbuhan tanaman kopi (Ulung, 2014). Di Indonesia dikenal beberapa jenis kopi, diantaranya adalah kopi arabika, kopi robusta dan kopi spesial Indonesia. Kopi robusta (*C. canephora*) masuk ke Indonesia tahun 1990 (Prastowo, 2010). Kopi jenis ini tahan terhadap penyakit HV, dan memerlukan syarat tumbuh dan pemeliharaan yang ringan, sedang produksinya lebih tinggi daripada kopi jenis arabika dan liberika (rata-rata  $\pm$  9-13 ku kopi beras/ha/th) dan bila dikelola secara intensif kopi robusta bisa berproduksi

20 ku/ha/th. Karena mempunyai sifat lebih unggul, kopi ini sangat cepat berkembang sehingga mendominasi perkebunan kopi di Indonesia hingga saat ini (Danarti dan Najiyati, 2001). Dan saat ini Indonesia menjadi negara pengekspor kopi terbesar ketiga di dunia setelah Brazil dan Vietnam (Ulung, 2014)

#### 2.4.1 Taksonomi Kopi Robusta

Taksonomi Kopi Robusta berdasarkan penggolongan dan tata nama adalah sebagai berikut (Tabel 2.2).

Tabel 2.2 Taksonomi kopi robusta

Tingkatan	
Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Super Divisi	Spermatophyta
Divisi	Magnoliophyta
Kelas	Magnoliopsida
Sub Kelas	Asteridae
Ordo	Rubiales
Famili	Rubiaceae
Ganus	<i>Coffea</i>
Spesies	<i>C. canephora</i>

Sumber : Raharjo, 2012

#### 2.4.2 Habitat Kopi Robusta

Pasar kopi nasional terdiri dari 10% kopi arabika dan 90% kopi robusta (Raharjo, 2012). Kopi robusta dapat tumbuh pada ketinggian sampai 800m dpl, optimumnya sekitar 500-700m dpl. Curah hujan yang sesuai sekitar 1500-2500 mm per tahun dengan rata-rata bulan kering 1-3 bulan dan suhu rata-rata 15-25<sup>0</sup>C dengan lahan kelas S1 dan S2 (Puslitkoka, 2006). Perbanyakan tanaman kopi dapat dilakukan dengan stek sambung ataupun dengan menanam/ menyemai bijinya, dan untuk perawatan bisa diberikan pupuk kandang untuk menunjang pertumbuhan tanaman (Ulung, 2014).

### 2.4.3 Deskripsi Botani Kopi Robusta

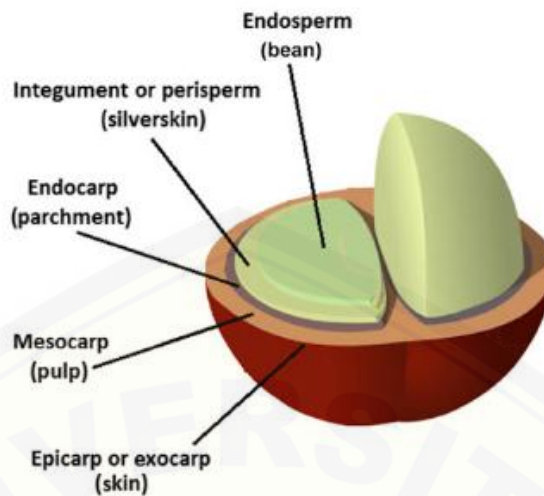
Tanaman kopi secara umum memiliki akar tunggang, batang yang keras dan berwarna putih keabu-abuan, dengan daun yang mengkilat berbentuk bulat telur dengan tepian rata dan pangkal yang tumpul, daun dewasa berwarna hijau tua dan daun muda berwarna perunggu. Bunganya merupakan bunga berjenis majemuk dengan warna hijau berbentuk seperti payung, kelopaknya terbagi lima bagian (Gambar 2.3). Untuk buahnya berbentuk bulat telur. Ketika muda berwarna hijau dan akan berubah menjadi berwarna merah tua saat matang. Bijinya berbentuk bulat telur, berbelah dua (dikotil), dan mempunyai kulit luar yang keras (kulit tanduk) (Gambar 2.4) serta banyak dimanfaatkan masyarakat dunia untuk diolah menjadi minuman (Ulung, 2014).



Gambar 2.3 Tanaman kopi. A. Gambar asli. B. Gambar skematik (Farah dan Santos, 2015)

Banyak varietas kopi yang ada dipasaran, namun hanya ada 2 jenis kopi yang populer dikenal oleh masyarakat luas, yaitu kopi robusta dan arabika. Secara umum kedua jenis kopi tersebut memiliki ciri-ciri botani seperti diatas. Perbedaan yang terlihat dari kedua jenis kopi tersebut ialah biji kopi robusta lebih berwarna coklat kehitaman sedangkan kopi arabika berwarna hijau dan merah serta mempunyai ukuran yang lebih kecil (Ulung, 2014).





Gambar 2.4 Buah dan biji kopi (Farah dan Santos, 2015)

#### 2.4.4 Kandungan Kopi Robusta

Bagian tanaman kopi yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat ialah biji kopi. Karena dalam biji kopi terdapat banyak senyawa kimia, baik yang *volatile* maupun *nonvolatile*. Untuk senyawa kimia yang bersifat *nonvolatile* yang ada dalam biji kopi berupa air, karbohidrat, serat, protein, asam amino, lemak, mineral, asam organik, asam klorogenik, trigonelin dan kafein (Tabel 2.3) (Farah, 2012). Selain itu terdapat senyawa fenol, yang merupakan senyawa kimia yang mengandung senyawa hidroksil (-OH) yang mempunyai aktivitas antioksidan (Ariesta, 2013). Kandungan senyawa yang ada dalam biji kopi selain ditentukan dari genetik tanaman, juga ditentukan dari faktor ekstrinsik yang berupa komposisi tanah, iklim, *agriculture practice*, dan ketika biji kopi tersebut disimpan (Farah, 2012).

Tabel 2.3 Kandungan senyawa dalam biji kopi robusta

Komponen	Konsentrasi (g/ 100g)			
	Green Coffea arabica	Roasted Coffea Arabica	Green Coffea robusta	Roasted Coffea robusta
<b>Karbohidrat/ fiber</b>				
Sukrosa	6.0 – 9.0	4.2	0.9 – 4.0	1.6
Reducing sugar	0.1	0.3	0.4	0.3
Polisakarida	34.0 – 44.0	31.0 – 33.0	48.0 – 55.0	37.0
Lignin	3.0	3.0	3.0	3.0
Pectin	2.0	2.0	2.0	2.0
<b>Senyawa Nitrogen</b>				
Protein	10.0 – 11.0	7.5 – 10.0	11.0 – 15.0	7.5 – 10.0
Asam Amino	0.5	ND	0.8 – 1.0	ND
Kafein	0.9 – 1.3	1.1 – 1.3	1.5 – 2.5	2.4 – 2.5
Trigoneline	0.6 – 2.0	1.2 – 0.2	0.6 – 0.7	0.7 – 0.3
Asam nikotinik	-	0.016 – 0.026	-	0.014 – 0.025
<b>Lemak</b>				
Minyak kopi	15.0 – 17.0	17.0	7.0 – 10.0	11.0
<i>Diterpenes</i>	0.5 – 1.2	0.9	0.2 – 0.8	0.2
Mineral	3.0 – 4.2	4.5	4.4 – 4.5	4.7
<b>Asam dan Ester</b>				
Asam klorogenik	4.1 – 7.9	1.9 – 2.5	6.1 – 11.3	3.3 – 3.8
Asam aliphatic	1.0	1.6	1.0	1.6
asam quinic	0.4	0.8	0.4	1.0
<i>Melanoidins</i>	-	25.0	-	25.0

Sumber : Farah, 2012

Beberapa senyawa dalam biji kopi yang mempunyai efek sebagai antibakteri antara lain.

a. Kafein

Kafein dengan rumus kimia ( $C_8H_{10}N_4O_2$ ) atau 1, 3, 7 trimetilxantin merupakan salah satu senyawa alkaloid atau xantin alkaloid yang berbentuk bubuk putih, tidak berbau dan mempunyai rasa pahit. Mempunyai densitas  $1,2 \text{ g/cm}^3$ , dengan pH 6.9. Kelarutan kafein dalam air sekitar 21,7 mg/ml pada suhu  $25^\circ\text{C}$  dan 670 mg/ml pada suhu  $100^\circ\text{C}$ . kafein mempunyai titik didih  $178^\circ\text{C}$  dan titik leleh  $238^\circ\text{C}$  (Nonthakaew *et al.*,2015) Kafein yang terdapat dalam biji kopi dapat dimanfaatkan dalam bentuk obat maupun dalam bentuk makanan atau minuman. Konsentrasi kafein dalam *C. cannephora* dua kali lebih banyak dari pada *C. arabica* (Widyotomo dan Mulato, 2007).

Kafein mempunyai efek menstimulasi sistem saraf pusat sebagai antagonis reseptor adenosin. Konsumsi kafein dalam jumlah sedikit hingga sedang atau disesuaikan dengan kebutuhan dan kondisi tubuh dapat meningkatkan kewaspadaan, performa dan bisa meningkatkan *mood*. Tapi, jika dosis yang dikonsumsi berlebih dan mempunyai toleransi terhadap kafein rendah dapat mengakibatkan efek buruk, seperti cemas, takikardi, dan insomnia (Farah, 2012). Lebih parah dapat menyebabkan penyakit jantung, tekanan darah tinggi, kanker dan keguguran (Widyotomo dan Mulato, 2007).

Hasil metabolit kafein, khususnya 1-methylxantine dan 1-methylurate mempunyai aktivitas antioksidan secara *in vitro* dan reduksi besi secara *in vivo*. Kemampuan reduksi besi lebih besar pada kopi hijau dibanding kopi yang sudah di dekafeinasi, begitu juga dengan efek antimikroba dalam melawan mikroorganisme kariogenik (Farah, 2012). Kemampuan antibakteri kafein disebabkan oleh gugus basa yang terkandung dalam kafein. Gugus basa akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel dan DNA bakteri yang merupakan penyusun utama inti sel dan sebagai pusat pengaturan segala aktivitas sel, sehingga mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino yang dapat menyebabkan perubahan keseimbangan genetik bakteri dan DNA bakteri akan mengalami kerusakan. Kerusakan DNA akan menyebabkan lisis pada inti sel bakteri (Yaqin dan Nurmilawati, 2015).

b. Trigonelin

Trigonelin merupakan senyawa alkaloid yang diturunkan dari enzim metilasi asam nikotik. Berkontribusi dalam memberikan rasa pahit dalam masakan. Jumlah trigonelin dalam *C. canephora* adalah 2/3 lebih banyak dari *C. Arabica* (Farah, 2012). Senyawa trigonelin dapat menghambat sel kanker yang invasif secara *in vitro*, meregenerasi dendrit dan axon pada hewan coba, serta meningkatkan memori. Demetilasi trigonelin selama pembakaran menghasilkan asam nikotik

dan niasin (Farah, 2012). Selain itu bersama dengan asam klorogenik dan fenol memberikan efek antibakteri yang berkerja dengan merusak dinding sel bakteri melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri (Yaqin dan Nurmilawati, 2015).

c. Asam Klorogenik

Asam klorogenik merupakan ester dari asam trasinamik dan asam quinik. Kandungan terbanyak berada dalam biji kopi, yaitu mendekati 14%. Senyawa ini berperan dalam menentukan kualitas dan rasa dari kopi. Selain itu ester dari asam klorogenik yang berupa asam kafeik, asam ferulik, dan asam p-koumarik mempunyai kemampuan sebagai antioksidan (Farah, 2012). Asam klorogenik bersama dengan trigonelin dan asam kafeik dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* (Mussato *et al.*, 2010). Bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri (Yaqin dan Nurmilawati, 2015).

## 2.5 Uji Antimikroba

Uji antimikroba bertujuan untuk menentukan potensi antimikroba, selain itu digunakan sebagai kontrol kualitas selama proses produksi senyawa antimikroba di pabrik, dan untuk memonitor atau mengontrol kemoterapi obat. Pada uji ini dilakukan pengukuran respon pertumbuhan populasi mikroorganisme terhadap agen antimikroba. Kegunaan dari uji ini ialah didapatkannya suatu sistem pengobatan yang efektif dan efisien (Pratiwi, 2008). Pengukuran aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan metode difusi dan pengenceran (dilusi).

### 2.5.1 Metode Difusi (tes *Kirby & Bauer*)

Merupakan salah satu metode uji antibakteri yang sering digunakan di laboratorium klinik untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Jenis-jenis Metode difusi *Kirby & Bauer* antara lain.

- a. Metode silinder dilakukan dengan cara meletakkan silinder yang terbuat dari besi tahan karat dengan posisi tegak di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Selanjutnya tiap silinder diisi dengan larutan uji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, dilakukan pengamatan pada pertumbuhan bakteri dengan melihat ada tidaknya zona bening di sekeliling silinder.
- b. Metode lubang dilakukan dengan cara melubangi media yang telah diinokulasi dengan bakteri. Kemudian lubang diisi dengan larutan uji. Setelah diinkubasi, dilakukan pengamatan pada pertumbuhan bakteri dengan melihat ada tidaknya zona bening di sekeliling lubang.
- c. Metode cakram dilakukan dengan meletakkan kertas cakram yang telah direndam atau ditetesi dengan larutan uji, kemudian diletakkan di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri, selanjutnya diinkubasi. Setelah diinkubasi, dilakukan pengamatan pada pertumbuhan bakteri dengan melihat ada tidaknya zona bening disekeliling cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2006).

### 2.5.2 Metode Dilusi

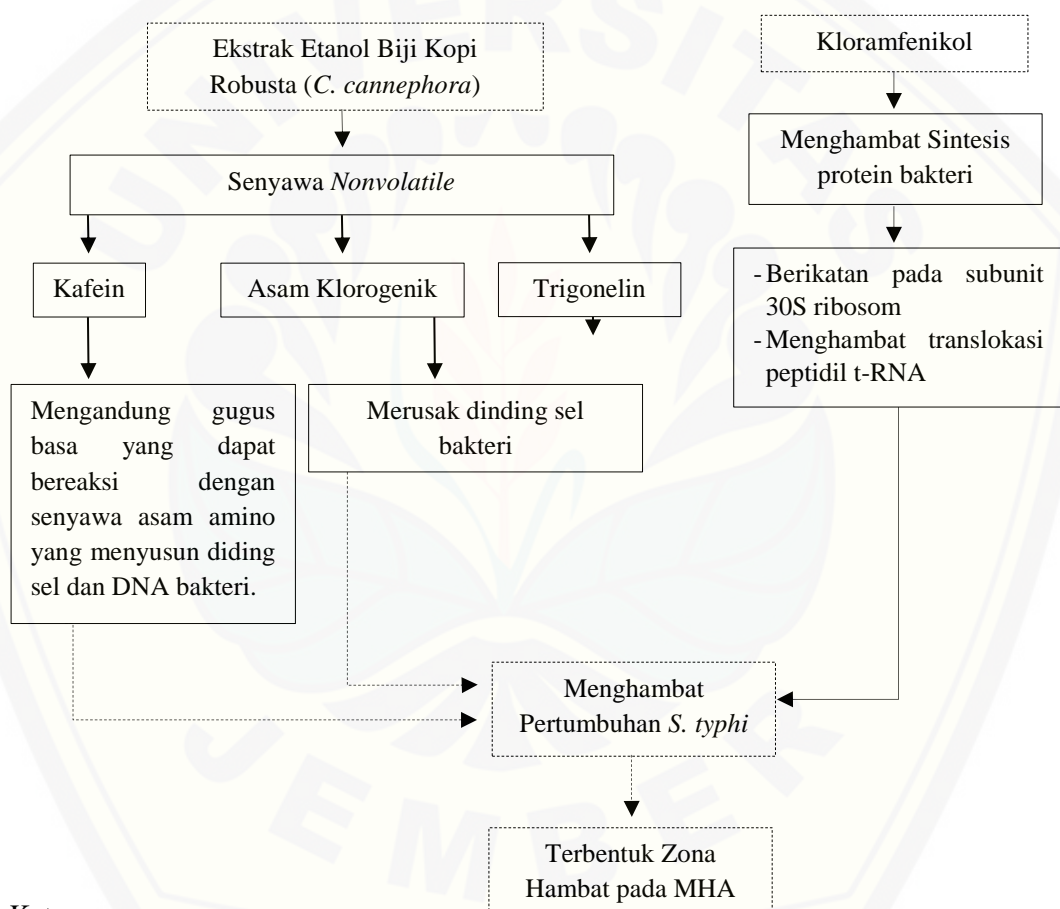
Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*).

- a. Metode dilusi cair, dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Pada metode ini dapat diketahui Kadar Hambat Minimal, yaitu larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang masih terlihat zona jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji. selanjutnya larutan yang ditetapkan sebagai KHM, dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba dan diinkubasi

selama 18-24 jam. Media cair yang terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, 2008).

- b. Metode dilusi padat, media yang digunakan berupa media padat dengan prosedur yang mirip dengan metode dilusi cair. Keuntungan dengan menggunakan metode ini adalah satu konsentrasi larutan uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi, 2008).

## 2.6 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :

----- : Diteliti

————— : Tidak diteliti

Gambar 2.5 Skema kerangka konsep

Ekstrak etanol biji kopi robusta diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* dikarenakan beberapa kandungan senyawa *nonvolatile* dalam biji

kopi robusta, seperti asam klorogenik, kafein, dan trigonelin memiliki efek antibakteri. Mekanisme kerja kafein sebagai antibakteri adalah dengan bereaksinya gugus basa yang ada dalam kafein dengan asam amino yang menyusun dinding sel dan DNA bakteri, adanya reaksi tersebut menyebabkan perubahan keseimbangan genetik sehingga DNA bakteri akan mengalami kerusakan dan pada akhirnya terjadi lisis pada inti sel bakteri. Sedangkan asam klorogenik dan trigonelin bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri (Yaqin dan Nurmilawati, 2015). Sedangkan mekanisme kerja kloramfenikol sebagai antibiotik yang menghambat pertumbuhan *S. typhi* adalah sebagai inhibitor sintesis protein, dengan cara menghambat perlekatan asam amino ke rantai peptida yang baru secara reversibel pada unit 50S ribosom dengan mengganggu kerja enzim peptidil tranferase, enzim ini berfungsi membentuk ikatan peptida antara asam amino baru yang masih melekat pada tRNA dengan asam amino terakhir yang sedang berkembang (Pratiwi, 2008).

## 2.7 Hipotesis

Ekstrak etanol biji kopi Robusta (*C. canephora*) mampu menghambat pertumbuhan *S. typhi* secara *in vitro*.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

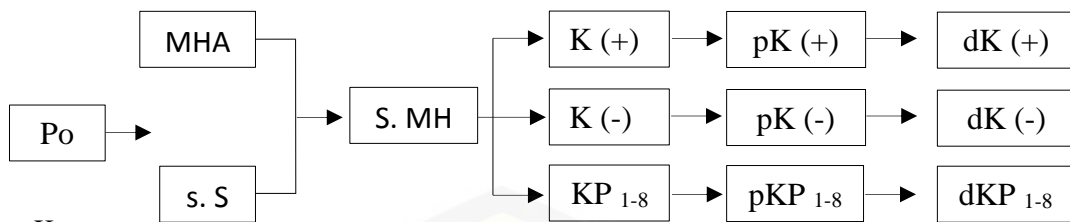
Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen semu (*quasi experimental design*), dikarenakan dalam penelitian ini terdapat manipulasi terhadap variabel bebas, berupa konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta dengan 8 tingkatan dosis. Namun penelitian ini tidak ada randomisasi dalam pemilihan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Teknik yang digunakan adalah *disk diffusion* untuk melihat peranan ekstrak etanol biji kopi robusta dalam menghambat pertumbuhan *S. typhi* (Swarjana, 2010).

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan berupa *post only control group design*, dikarenakan pengukuran atau observasi hanya dilakukan setelah perlakuan diberikan pada kelompok (Gambar 3.1). Dalam penelitian ini terdapat 10 kelompok, yaitu.

1. Kelompok P1 : ekstrak etanol biji kopi robusta konsentrasi 500 mg/ml
2. Kelompok P2 : ekstrak etanol biji kopi robusta konsentrasi 400 mg/ml
3. Kelompok P3 : ekstrak etanol biji kopi robusta konsentrasi 300 mg/ml
4. Kelompok P4 : ekstrak etanol biji kopi robusta konsentrasi 200 mg/ml
5. Kelompok P5 : ekstrak etanol biji kopi robusta konsentrasi 100 mg/ml
6. Kelompok P6 : ekstrak etanol biji kopi robusta konsentrasi 75 mg/ml
7. Kelompok P7 : ekstrak etanol biji kopi robusta konsentrasi 50 mg/ml
8. Kelompok P8 : ekstrak etanol biji kopi robusta konsentrasi 25 mg/ml
9. Kelompok K(+) : kontrol positif dengan kloramfenikol
10. Kelompok K(-) : kontrol negatif dengan aquades steril





Keterangan :

Po : Populasi *S. typhi*

s. S : Pembuatan suspensi bakteri *S. typhi*

MHA : Pembuatan media dari *Mueller Hinton Agar*

S. MH : Kultur *S. typhi* pada media *Mueller Hinton*

K(+): : Kelompok kontrol positif

K(-): : Kelompok kontrol negatif

KP<sub>1-8</sub> : Kelompok perlakuan 1-8

pK (+) : Perlakuan pada kelompok kontrol positif dengan kloramfenikol

pK (-) : Perlakuan pada kelompok kontrol negatif dengan aquades steril

pKP<sub>1-8</sub> : Perlakuan dengan menggunakan ekstrak etanol biji kopi robusta dengan konsentrasi 500mg/ml; 400mg/ml; 300mg/ml; 200mg/ml; 100 mg/ml; 75 mg/ml; 50mg/ml; dan 25 mg/ml

dK (+) : Data kelompok kontrol positif setelah perlakuan

pK (-) : Data kelompok kontrol negatif setelah perlakuan

dKP<sub>1-8</sub> : Data kelompok perlakuan 1-8 setelah perlakuan

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

### 3.3 Sampel *S. typhi*

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah koloni bakteri *S. typhi*. Berasal dari *stock culture* milik laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang disesuaikan dengan standar 0,5 Mc. Farland.

#### 3.3.1 Ukuran Sampel (Sampel Size)

Ukuran sampel dalam penelitian ini dihitung melalui rumus *Federer*, dengan total kelompok berjumlah 10 kelompok, yaitu 2 kelompok kontrol dan 8 kelompok perlakuan.

$(k-1)(n-1) \geq 15$	Keterangan : k = jumlah kelompok n = jumlah pengulangan
<b>K=7</b>	
$(7-1)(n-1) \geq 15$	
$6(n-1) \geq 15$	
$6n-6 \geq 15$	
$6n \geq 21$	
$n \geq 3,5$	

Berdasarkan rumus di atas, penelitian ini akan dilakukan pengulangan sebanyak empat (4) kali.

### 3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan pembuatan ekstrak di laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran dan laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

#### 3.4.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober - November 2016.

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol biji kopi robusta, konsentrasi yang digunakan adalah 500mg/ml; 400mg/ml; 300mg/ml; 200mg/ml; 100 mg/ml; 75 mg/ml; 50mg/ml; dan 25 mg/ml.

#### 3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat *S. typhi* yang terbentuk pada media MHA.

### 3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah alat dan bahan, prosedur sterilisasi alat dan bahan, media MH, pembuatan suspensi *S. typhi*, kultur *S.typhi* pada media MH, dan teknik pengukuran zona hambat.

## 3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Ekstrak biji kopi robusta adalah ekstrak yang diperoleh dengan cara menumbuk biji kopi robusta kering sebanyak 300gr hingga menjadi bubuk yang halus, lalu dimaserasi dengan larutan etanol 96% sebanyak 1200ml selama 24 jam dengan menggunakan *shaker bath*, kemudian disaring dan dievaporasi sampai mendapatkan ekstrak pekat dengan konsentrasi 100%.

3.6.2 Diameter zona hambat *S. typhi* adalah kemampuan suatu bahan dalam menghambat atau membunuh pertumbuhan populasi *S. typhi*, dengan cara melihat dan mengukur daerah yang jernih di sekitar cakram dengan menggunakan jangka sorong. Daerah yang jernih tersebut adalah daerah yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

## 3.7 Alat dan Bahan

### 3.7.1 Alat Penelitian

*Shaker bath*, *rotatory evaporator*, *kapas swab*, lidi kapas steril, *petridish*, ose, bunsen, korek api, tabung reaksi, rak tabung, tabung vial, timbangan/neraca, tabung erlenmeyer, *beaker glass*, spatula kaca, *syringe*, jangka sorong, sterilisator, *autoclave*, mikropipet, tip mikropipet, pinset, inkubator, *laminar flow*, *thermolyne*, desikator, borer steril (diameter 5 mm), vortex, *aluminium foil*, kertas saring (merek *Whatmann*) dan pencatat waktu.

### 3.7.2 Bahan Penelitian

Biji kopi robusta kering, *nutrient broth*, *Mueller Hinton* agar, aquades steril, etanol 96%, spirtus, antibiotik kloramfenikol 250 mg, antibiotik

kloramfenikol *disk* , *blank disk*, bakteri *S. typhi*, alkohol 70%, larutan NaCl, kertas saring (merek *Whatmann*)

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 Tahap Persiapan

a. Mengurus *ethical clearance*

Mengirim berkas permohonan *ethical clearance* ke komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember, setelah selesai, kemudian dilakukan penelitian.

b. Persiapan alat

Semua alat yang akan digunakan dicuci dan dikeringkan terlebih dahulu, untuk alat yang berbahan kaca di sterilkan dengan menggunakan sterilisator pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit, dan untuk yang berbahan plastik diusap dengan alkohol 70%.

c. Persiapan biji kopi robusta

Biji kopi robusta dibeli dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember yang berada di daerah Jenggawa, Jember, dengan kriteria biji kopi robusta kering, tidak keriput, dan sudah matang dengan warna coklat kehitaman serta disimpan dalam wadah yang kering.

d. Membuat ekstrak biji kopi robusta dan pengenceran ekstrak

Ekstrak biji kopi robusta diperoleh dengan cara menumbuknya sampai diperoleh serbuk halus. Kemudian ditimbang sebanyak 300 gr dengan menggunakan neraca timbang dan dimaserasi dengan menggunakan *shaker bath* selama 24 jam dengan penambahan larutan etanol 96% sebanyak 1200 ml agar zat aktif yang terdapat di dalam biji kopi robusta dapat tertarik oleh pelarut, karena sama-sama bersifat polar. Setelah itu disaring dengan menggunakan pompa vakum. Kemudian dipekatkan dengan *rotatory evaporator* 3-5 hari sehingga didapat ekstrak pekat sebanyak 10 ml. dari ekstrak pekat tersebut diambil 1000 mg dan ditambahkan dengan 1 ml aquades steril sehingga didapatkan konsentrasi 1000mg/ml. Untuk membuat sediaan dengan konsentrasi 500mg/ml,

dilakukan dengan cara mengambil 1 ml sediaan 1000mg/ml dicampur dengan 1 ml aquades steril. Sediaan konsentrasi 400mg/ml dibuat dengan cara mengambil 1ml sediaan 500mg/ml dicampur dengan 0,25 ml aquades steril. Sediaan konsentrasi 300mg/ml dibuat dengan cara mengambil 1ml sediaan 400mg/ml dicampur dengan 0,33 ml aquades steril. Sediaan konsentrasi 200mg/ml dibuat dengan cara mengambil 1ml sediaan 300mg/ml dicampur dengan 0,5 ml aquades steril. Sediaan konsentrasi 100mg/ml dibuat dengan cara mengambil 1ml sediaan 200mg/ml dicampur dengan 1 ml aquades steril. Sediaan konsentrasi 75mg/ml dibuat dengan cara mengambil 1ml sediaan 100mg/ml dicampur dengan 0,33 ml aquades steril. Sediaan konsentrasi 50mg/ml dibuat dengan cara mengambil 1ml sediaan 75mg/ml dicampur dengan 0,5 ml aquades steril. Dan sediaan konsentrasi 25mg/ml dibuat dengan cara mengambil 1ml sediaan 50mg/ml dicampur dengan 1 ml aquades steril (Lampiran A) (Murtafiah, 2012).

e. Pembuatan media *Mueller Hinton*

Melarutkan 38 gram agar *Mueller Hinton* ke dalam 1000 ml aquades di dalam tabung Erlenmeyer. Diaduk menggunakan *stirrer* hingga merata dan dipanaskan hingga mendidih sampai semua larut menjadi satu. Setelah itu disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. lalu dituangkan ke dalam *petridish* sebanyak 10-20 ml dan diratakan. Kemudian dimasukkan dalam inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C. Dan bila sudah jadi disimpan dalam suhu 8-15 <sup>0</sup>C apabila tidak langsung digunakan (HiMedia Laboratories, 2011).

f. Pembuatan suspensi bakteri *S. typhi*

Dilakukan dengan cara mengambil satu ose biakan bakteri yang berasal dari *stock culture* milik laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Kemudian dimasukkan dalam tabung berisi 5 ml media *nutrient broth* (NB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. suspensi bakteri tersebut diencerkan dengan menggunakan NaCl 0,9% steril sampai kekeruhannya setara dengan larutan standar 0,5 Mc.

Farland. Latutan 0,5 Mc. Farland adalah larutan kontrol yang dibuat dengan mencampurkan 0,5ml BaCl<sub>2</sub> 0,048 M dan 99,5ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 M, berfungsi sebagai standar untuk menetapkan kekeruhan suspensi bakteri dan setara dengan  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  sel/ml (Nuria, 2010).

g. Pembuatan suspensi antibiotik

Kadar hambat minimal kloramfenikol untuk bakteri *S. typhi* adalah 30 µg. Kapasitas volume dari kertas saring *Whatman* adalah 10 µl, sehingga didapatkan konsentrasi kloramfenikol 3 µg/µl (3 mg/ml). Untuk membuat sediaan tersebut, antibiotik kloramfenikol diambil sebanyak 375 mg dan dilarutkan dalam 2,5 ml etanol, dan dilakukan pengenceran secara serial sampai didapatkan konsentrasi 3 mg/ml (Lampiran B).

h. Kultur bakteri *S. typhi* pada media *Mueller Hinton*

Suspensi *S. typhi* yang telah dibuat diambil dengan mencelupkan lidi kapas steril, setelah lidi kapas tercelup seluruhnya, peras lidi kapas dengan menekan lidi kapas pada bagian dalam dari tabung suspensi, hal ini dilakukan untuk membuang media cair yang ikut terbawa. Selanjutnya mengusapkan lidi kapas pada seluruh permukaan media MH sampai terdistribusi merata. Kemudian didiamkan kurang lebih 5 menit pada suhu ruang supaya kering dan bakteri menempel pada permukaan media (Fitrah *et al.*, 2013).

### 3.8.2 Tahap Perlakuan

a. Pemberian kertas label di bagian bawah *petridish*

Semua perlakuan dilakukan di dalam *laminar flow* untuk mencegah kontaminasi dengan lingkungan luar. Pada bagian bawah masing-masing *petridish*, diberi kertas label sesuai dengan perlakuan yang diberikan (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, K(+), dan K(-)).

b. Uji efektivitas ekstrak etanol biji kopi robusta terhadap *S. typhi*

Kertas cakram dibuat dari kertas saring *Whatmann* yang dilubangi dengan pelubang kertas, dengan diameter 6 mm. Selanjutnya cakram ditetesi dengan ekstrak etanol biji kopi robusta dengan masing-masing

konsentrasi, kontrol positif dengan suspensi kloramfenikol, kontrol negatif dengan aquades streil sebanyak 10 µl. Setelah cakram kering dimasukkan ke dalam *petridish* yang terdapat kultur bakteri *S. typhi* sesuai dengan tempat yang telah diberi label. Kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37<sup>0</sup>C.

### 3.8.3 Tahap Pengukuran Zona Hambat

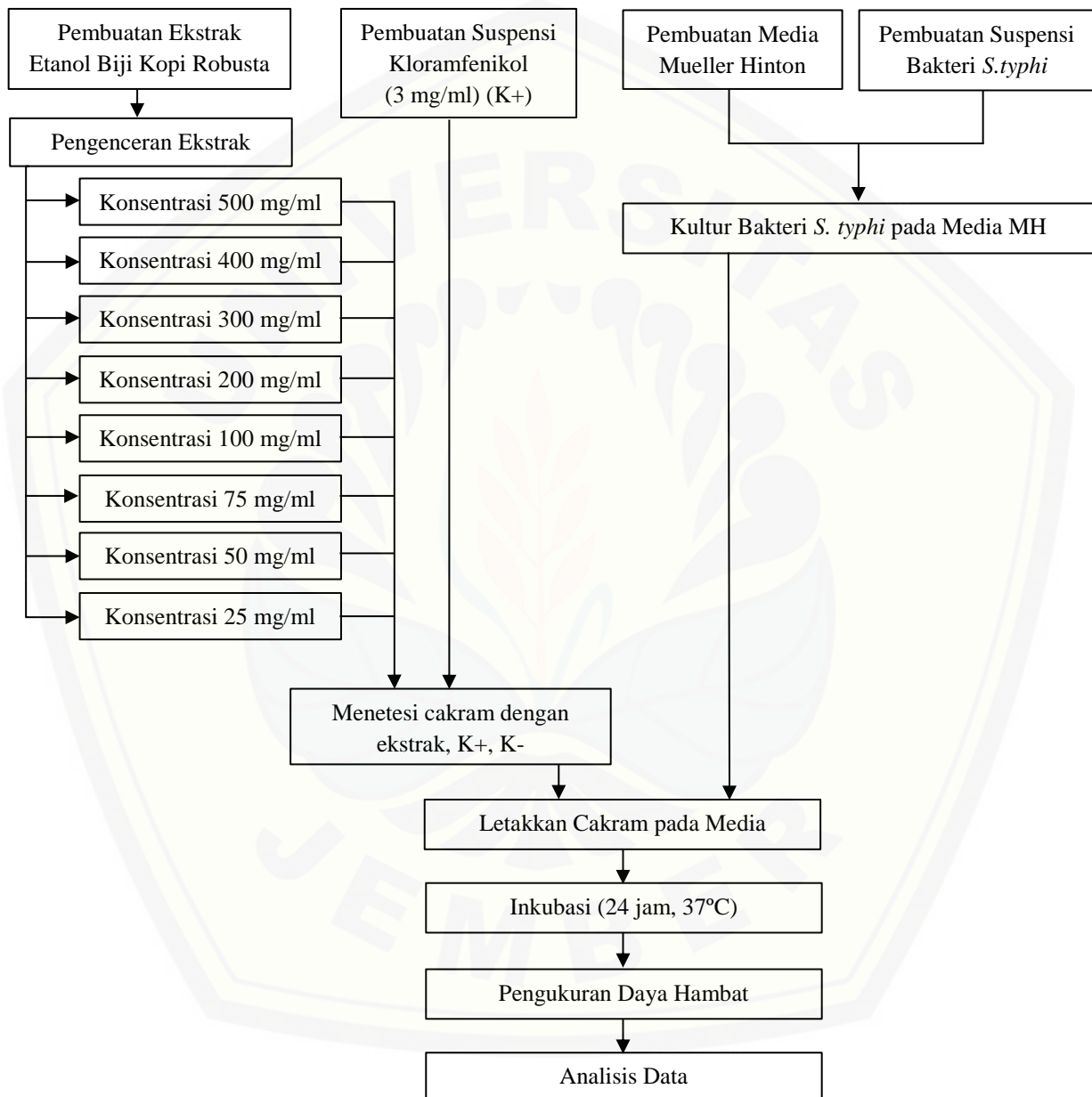
Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, *petridish* dikeluarkan, kemudian dilakukan pengukuran zona hambat terhadap pertumbuhan *S. typhi*. pengukuran zona hambat dilakukan dengan cara membalikkan *petridish*, diameter zona hambat adalah daerah jernih yang berada disekitar cakram, diukur dengan menggunakan jangka sorong. Jika zona hambat berbentuk lonjong, maka pengukuran dilakukan pada diameter pendek dan diameter panjang, kemudian keduanya ditambahkan dan dibagi 2 (Vandepitte *et al.*, 2003)

## 3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif dan statistik. Pertama, dilakukan uji normalitas untuk melihat distribusi data dengan menggunakan Uji *Sahpiro Wilk*. Selanjutnya diuji dengan uji korelasi bivariat sederhana untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dengan variabel terikat, apabila data terdistribusi normal analisis dilakukan uji *Pearson*, sedangkan jika tidak dilakukan uji *Spearman*. Analisis selanjutnya yaitu, uji regresi linier untuk mengetahui pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikat. Setelah itu dilakukan uji homogenitas untuk melihat varian data, jika nilai signifikansi > 0,05 berarti data memiliki varian yang sama (homogen) dan sebaliknya jika nilai signifikansi < 0,05 berarti data tidak homogen. Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka untuk membandingkan lebih dari 2 variabel yang tidak berpasangan dapat dilakukan *uji one way Anova*, namun apabila data tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen, dilakukan transformasi terlebih dahulu dengan harapan data terdistribusi normal dan homogen. Apabila setelah dilakukan transformasi data tetap tidak memenuhi syarat tersebut, maka

dilakukan uji statistik non parametrik, yaitu uji *Kruskal-Wallis* yang dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Dahlan, 2008 dan Santjaka, 2015).

### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian



## BAB. 5 KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut.

1. Ekstrak etanol biji kopi robusta (*C. cannephora*) mempunyai efek sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *S. typhi* secara *in vitro*.
2. Konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol biji kopi robusta (*C. cannephora*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro* adalah 25 mg/ml secara kualitatif, dan 43,18 mg/ml secara kuantitatif.

### 5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh, penulis menyarankan sebagai berikut.

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak etanol biji kopi robusta (*C. cannephora*) terhadap *S. typhi*.
2. Perlu dilakukan penelitian serupa dengan mengambil senyawa antibakteri yang terdapat dalam biji kopi robsuta.
3. Perlu dilakukan uji lanjutan seperti uji secara *in vivo*, uji toksisitas, dan uji klinis agar biji kopi robusta (*C. cannephora*) dapat dimanfaatkan secara maksimal.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Adisasmito, A. W. 2006. Penggunaan Antibiotik pada Terapi Demam Tifoid Anak di RSAB Harapan Kita. Jakarta: *Sari Pediatri*. Vol. 8 (3): 174-180.
- Aida, A. N., Suswati, E., dan Misnawi. 2016. Uji *In Vitro* Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*. Vol 4 (1): 127-131
- Anggeraini, A. S., Hatta, M., dan Maidin, A. 2013. Mutasi Gen Cat P pada Bakteri *Salmonella typhi* yang Resisten Terhadap Khloramphenikol. Makassar: *JST Kesehatan*. Vol. 3 (4): 388-394.
- Ariesta, A. A. 2013. "Antimicrobial and Antioxidant Activities of Microwave-Assisted Extracts from Coffee Ground Residue in Chiang Rai Province, Thailand." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Bogor: Departement Food Science and Technology Faculty of Agriculture Technology Bogor Agriculture University.
- Bell, Pham, Rafferty, dan Allerton. 2016. *Antibiotic Susceptibility Testing by The CDS Method*. 8<sup>th</sup> ed. Australia. Departement of Microbiology, South Eastern Area Laboratory Service.
- Bharath, N., Sowmya, N, K., dan Metha, D, S. 2015. Determintion of Antibacterial Activity of Green Coffee Bean Extract on Periodotogenic Bacterial like *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotell intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcontaminans*: an *In Vitro* Study. India: *Contemporary Clinical Dentistry*. Vol 6 (2): 166-169.
- Dahlan, M. 2008. *Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Edisi Ketiga. Jakarta: Salemba Medika.
- Darmawati. 2009. Keanekaragaman Genetik *Salmonella typhi*. Semarang: *Jurnal Kesehatan*. Vol 2.
- Depkes RI. 2016. *Profil Kesehatan Indonesia 2015*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2014. *Statistika Perkebunan Indonesia 2013-2015: Kopi*. Jakarta: Direktorat Jendral Perkebunan.

- Farah, Adriana. 2012. *Coffee: Emerging Health Effect and Disease Prevention*. Blackwell Publishing.
- Farah, A., dan Santos, T. F. 2015. *Coffee in Health and Disease Prevention*. USA: Elsevier Inc.
- Fitrah, I. D., Darmawi, dan Rasmaidar. 2013. Isolasi *Pasteurella* pada Kuda dan Sensitivitasnya terhadap Antibiotik. Aceh: *Jurnal Medika Veterinaria*. Vol 7 (2): 121-125.
- Gilman, A. G. 2001. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. Edisi 10. The McGraw-Hill Companies, Inc. Terjemahan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB. 2012. *Goodman dan Gilman Dasar Farmakologi Terapi*. Edisi 10. Jakarta: EGC.
- Hafi, M. L. 2014. "Analisis Stabilitas pada Penyebaran Penyakit Demam Tifoid (Tifus) dengan Menggunakan Model Epidemik Seis." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Lembaga Penelitian Universitas Jember.
- Herliana, D., Husin, U. A., dan Nilapsari, R. 2015. *Hubungan antara Faktor Risiko dengan Kejadian Demam Tifoid pada Pasien yang di Rawat di Rumah Sakit Al-Islam Bandung Periode Februari – Juni 2015*. Bandung: Badan Penerbit Universitas Lampung.
- HiMedia Laboratories. 2011. *Mueller Hinton Agar*. India: HiMedia Laboratories.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg. 2004. *Medical Microbiology*. Edisi 25. The McGraw-Hill Companies, Inc. Terjemahan oleh Huriawati *et al.* 2013. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 25. Jakarta: EGC.
- Jindal, Tewari, Gautam, Pandey, dan Rishi. 2012. Immunological Characterization of Recombinant *Salmonella enterica serovar typhi* *fliC* Protein Expressed in *Escherichia coli*. *AMB Express a Springer Open Journal*. 2(55) [Serial Online]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3502275/>. [30 Agustus 2016].
- Kenisa, Y. P., Istiati, dan Setyari, W. 2012. Effect of Robusta Coffee Beans Ointment on Full Thickness Wound Healing. Surabaya: *Dental Journal*. Vol 45 (1).
- Kumalasari, E., dan Sulistyani, N. 2011. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Terhadap *Candida albicans* serta Skrining Fitokimia. Yogyakarta: *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Vol 1 (2): 51-62.

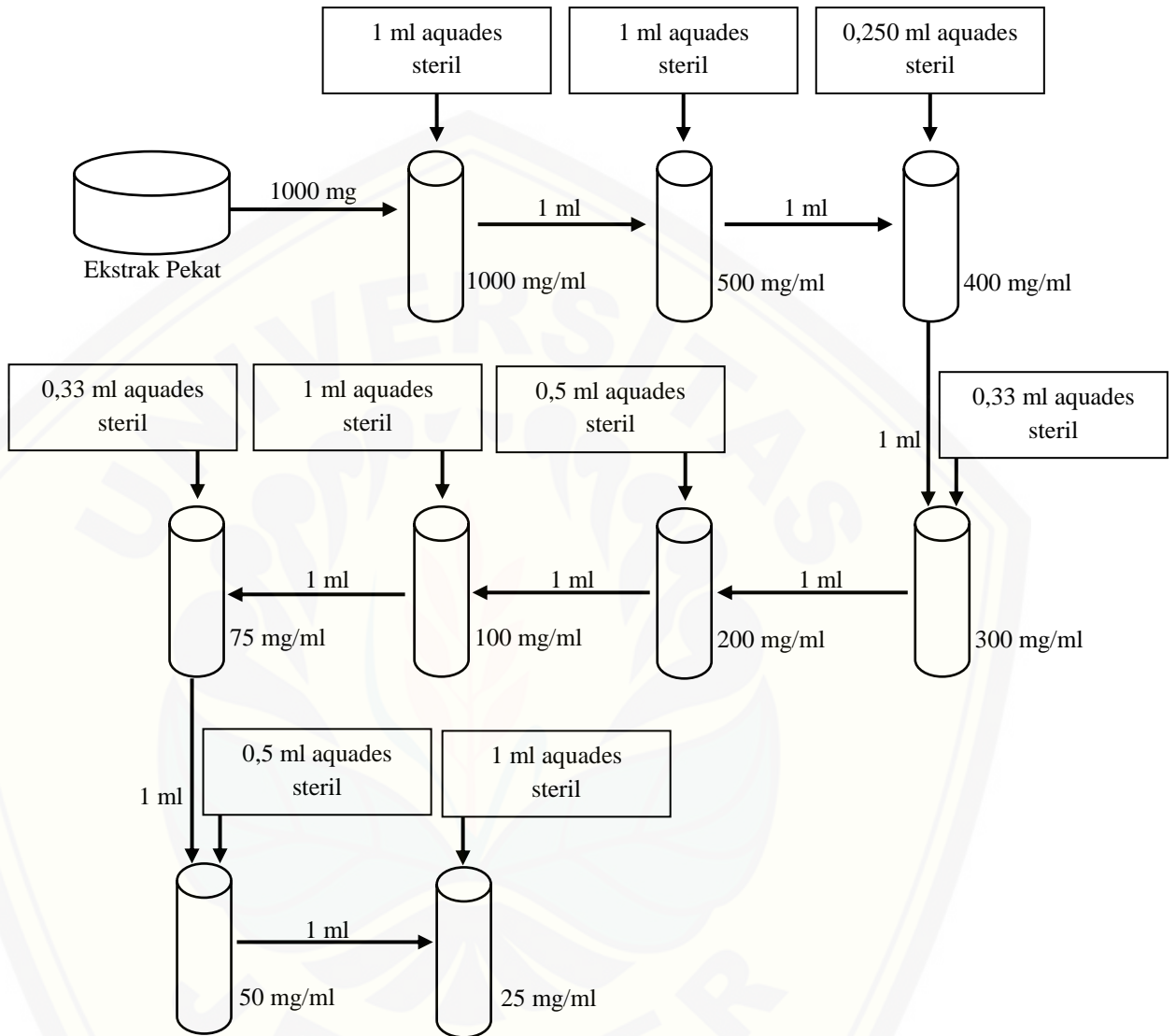
- Kusmiyati dan Agustini, N. W. S. 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruenta*. Bogor: *Biodiversitas*. Vol 8 (1): 48-53.
- Longo, D. L., dan Fauci, A. S. 2010. *Harrison's Gastroenterology and Hepatology*. The McGraw-Hill Companies, Inc. Terjemahan oleh Brahm. 2013. *Harrison: Gastroenterologi dan Hepatologi*. Jakarta: EGC.
- Murtafiah, A. 2012. "Daya Hambat Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) terhadap *Streptococcus mutans*". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Lembaga Penelitian Universitas Jember.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2014. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility; Twenty-Fourth Informational Supplement*. USA. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Nelwan, R. H. H. 2012. Tatalaksana Terkini Demam Tifoid. Jakarta: *CDK*. Vol. 39 (4): 247-250.
- Ningsih, D. R., Zufahair, dan Kartika, D. 2016. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak sebagai Antibakteri. Purwokerto: *Molekul*. Vol 11 (1): 101-111.
- Nonthakaew, Matan, Aewsiri, Matan. 2015. Caffeine in foods and its antimicrobial activity. *International Food Research Journal*. Vol 22 (1): 9-14.
- Nuria, M. C. 2010. Antibacterial Activities from Jangkang (*Homalocladium platycadum* (F. Muell) Bailey) Leaves. Semarang: *Mediagro*. Vol 6 (2): 9-15.
- Prastowo, Elna, Rubijo, Siswanto, Indrawanto, dan Munarso. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Bogor: Pusat Penelitian dan Perkembangan Perkebunan.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Puslitkoka. 2006. *Pedoman Teknis Tanaman Kopi*. Jember: Puslitkoka.
- Raharjo, P. 2012. *KOPI: Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rampengan, N. H. 2013. Antibiotik Terapi Demam Tifoid Tanpa Komplikasi pada Anak. Manado: *Sari Pediatri*. Vol. 14 (5): 271.

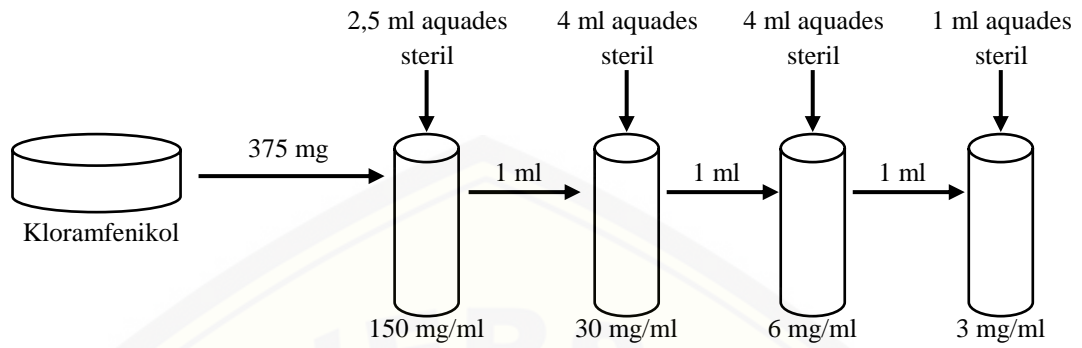
- Ratnasari, D., Setiabudi, D., dan Rakhmilla, L. E. 2015. Clinical Presentation and Laboratory Feature in Pediatric Thyphoid Fever Patient Susceptibility to First-line Antibiotic Therapy. Bandung: *Althea Medical Journal*. Vol. 2 (4).
- Santjaka, Aris. 2015. *Aplikasi SPSS untuk Analisis Data Penelitian Kesehatan*. Yogyakarta: Nuha Medika.
- Sari, M., dan Suryani, C. 2014. Pengaruh Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*L.) dalam Menghambat Pertumbuhan Jamur *Candida albicans* secara *In Vitro*. Medan: *Universitas Negeri Medan*.
- Silva, Lorio, Lobo, Santos, Farah, Maia, Antonio. 2015. Antibacterial effect of aqueous extract and bioactive chemical compounds of *Coffea canephora* againsts microorganism involved in dental caries and periodontal disease. *Scientific Research Publishing Inc*. Vol 4: 978-985.
- Soedarmo, Garna, Hadinegoro, dan Satari. 2015. *Buku Ajar Infeksi dan Penyakit Tropis*. Jakarta: FKUI.
- Suswati, E., dan Mufida, D. 2009. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Kedokteran dan Kesehatan*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Swarjana, I. K. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Edisi Revisi. Yogyakarta: CV. Andi Offset.
- Syarif *et al.*, 2012. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: FKUI.
- Todar, Kenneth. (Tanpa Tahun). Online Textbook of Bacteriology. [serial online] <http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html>. [31 Agustus 2016].
- Ulung, G., dan Pusat Studi Biofarmaka LPPM IPB. 2014. *Sehat Alami dengan Herbal*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Vandepitte, Verhaegen, Engbaek, Rohner, Piot, Heuck. 2003. *Basic Laboratory Procedure in Clinical Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. Geneva: WHO.
- Widodo, Djoko. 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, Jilid III*. Edisi Keenam. Jakarta: Interna Publishing.
- Widyotomo, S., dan Mulato. 2007. Kafein : Senyawa Penting pada Biji Kopi. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*. Vol. 23 (1): 44-50.

Yaqin, M. A., dan Nurmilawati, M. 2015. Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea robusta*) sebagai Penghambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Surakarta: Pendidikan Biologi FKIP UNS.



Lampiran 3.1 Skema Pengenceran Ekstrak Etanol Biji Kopi Robusta



**Lampiran 3.2 Skema Pengenceran Antibiotik Kloramfenikol**



**Lampiran 4.1 Persetujuan Etik Penelitian**

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
**KOMISI ETIK PENELITIAN**  
Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :  
fk\_unej@telkom.net

---

**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
*ETHICAL APPROVA*  
Nomor : 975 /H25.1.11/KE/2016

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora*)  
DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN *Salmonella thypi* SECARA *IN VITRO***

Nama Peneliti Utama : Rovian Cahya Prasetyo (NIM. 132010101049)  
*Name of the principal investigator*

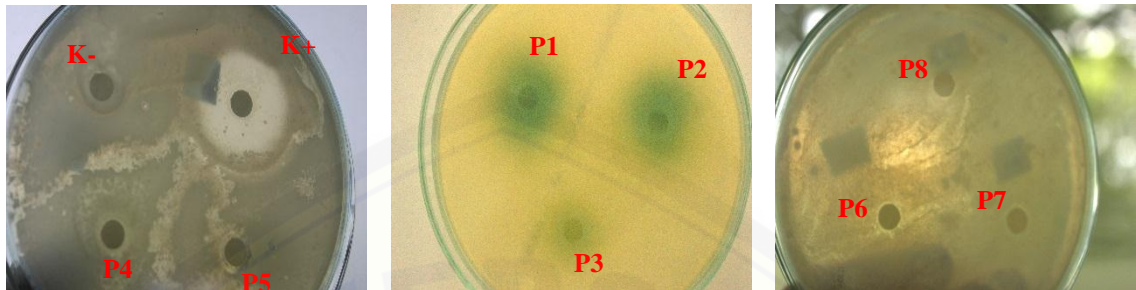
Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

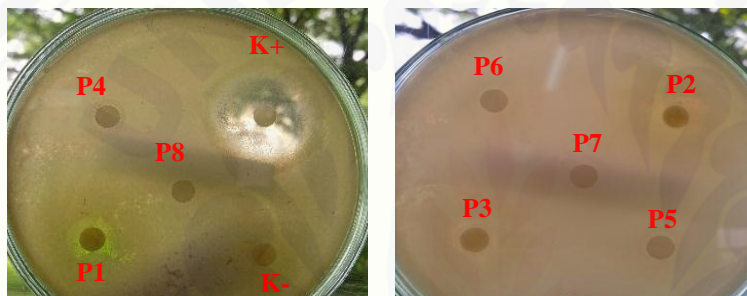
Jember, 13 Okt 2016  
  
dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran 4.2 Hasil Pengulangan 2, 3 dan 4

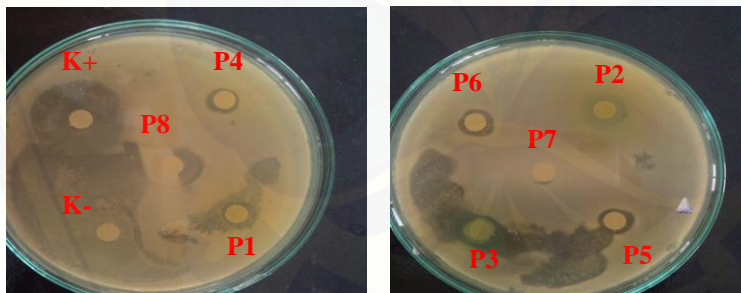
Pengulangan 2



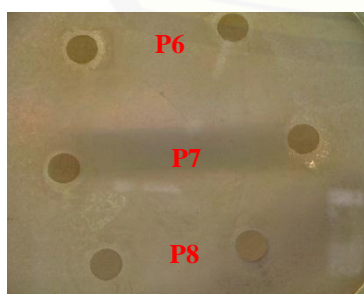
Pengulangan 3



Pengulangan 4



Pengulangan P6, P7, dan P8



Lampiran 4.3 Uji Normalitas *Sahpiro Wilk*

Serial Konsentrasi (mg/ml)	Diameter Zona Hambat (mm)				Rata- rata (mm)
	Pengulangan				
	I	II	II	IV	
K (-)	6*	6*	6*	6*	6*
25	6,40	6,10	6,20	6,00	6,17
50	7,60	7,25	7,80	8,25	7,72
75	8,60	7,60	8,00	7,40	7,90
100	8,75	8,10	9,30	8,20	8,58
200	9,20	8,95	8,30	8,80	8,81
300	16,55	10,92	6,00	12,10	11,39
400	19,90	12,03	11,40	14,00	14,33
500	21,40	13,02	11,50	14,10	15,00
K (+)	23,85	23,77	25,00	25,95	24,64

## Case Processing Summary

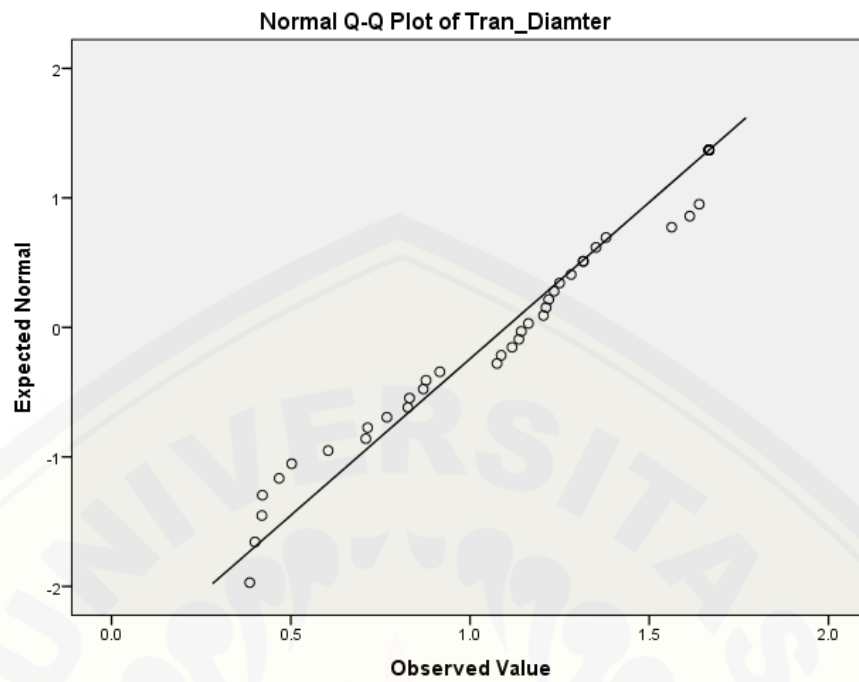
	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Tran_Diamter	40	100.0%	0	0.0%	40	100.0%

## Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Tran_Diamter	.101	40	.200*	.930	40	.016

\*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction



**Lampiran 4.4 Uji Korelasi Bivariat (Uji Spearman)**

<b>Correlations</b>			
		Tran_Diamter	Konsentrasi
Spearman's rho	Tran_Diamter		
	Correlation Coefficient	1.000	.914**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	40	40
	Konsentrasi		
	Correlation Coefficient	.914**	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	40	40

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

## Lampiran 4.5 Uji Regresi Linier Sederhana

Model Summary<sup>b</sup>

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.913 <sup>a</sup>	.834	.829	.17091

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

b. Dependent Variable: Tran\_Diamter

ANOVA<sup>a</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	5.563	1	5.563	190.448	.000 <sup>b</sup>
	Residual	1.110	38	.029		
	Total	6.673	39			

a. Dependent Variable: Tran\_Diamter

b. Predictors: (Constant), Konsentrasi

Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.386	.058		6.616	.000
	Konsentrasi	.130	.009	.913	13.800	.000

a. Dependent Variable: Tran\_Diamter

**Lampiran 4.6 Uji Homogenitas (*Levene Test*)****Test of Homogeneity of Variances**

Tran\_Diamter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.126	9	30	.002



**Lampiran 4.7 Analisis Komparasi (Uji Non-Parametrik *Kruskal Wallis*)**

Ranks			
	Konsentrasi	N	Mean Rank
Tran_Diamter	Kontrol Positif	4	2.50
	Konsentrasi 50%	4	9.00
	Konsentrasi 40%	4	10.25
	Konsentrasi 30%	4	17.63
	Konsentrasi 20%	4	19.00
	Konsentrasi 10%	4	21.25
	Konsentrasi 7.5%	4	26.38
	Konsentrasi 5%	4	27.38
	Konsentrasi 2.5%	4	34.13
	Kontrol Negatif	4	37.50
	Total		40

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
	Tran_Diamter
Chi-Square	33.150
df	9
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Konsentrasi



### Lampiran 4.8 Post Hoc Test (Uji Mann Whitney)

#### Uji Mann Whitney P1 dan P2

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tran_Diamter	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
	Konsentrasi 50%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

#### Uji Mann Whitney P1 dan P3

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tran_Diamter	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
	Konsentrasi 40%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P1 dan P4**

**Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 30%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P1 dan P5**

**Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 20%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P1 dan P6**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 10%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P1 dan P7**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 7.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P1 dan P8**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P1 dan P9**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 2.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P1 dan P10**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Kontrol Positif	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P2 dan P3**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 50%	4	4.00	16.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 40%	4	5.00	20.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-.577
Asymp. Sig. (2-tailed)	.564
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P2 dan P4**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 50%	4	3.50	14.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 30%	4	5.50	22.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P2 dan P5**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 50%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 20%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P2 dan P6**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 50%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 10%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P2 dan P7**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 50%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 7.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P2 dan P8**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 50%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P2 dan P9**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 50%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 2.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



**Uji Mann Whitney P2 dan P10**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 50%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P3 dan P4**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 40%	4	3.75	15.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 30%	4	5.25	21.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P3 dan P5**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 40%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 20%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P3 dan P6**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 40%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 10%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P3 dan P7****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 40%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 7.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P3 dan P8****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 40%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P3 dan P9****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 40%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 2.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P3 dan P10****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 40%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P4 dan P5**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tran_Diamter	Konsentrasi 30%	4	3.50	14.00
	Konsentrasi 20%	4	5.50	22.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P4 dan P6**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tran_Diamter	Konsentrasi 30%	4	3.50	14.00
	Konsentrasi 10%	4	5.50	22.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P4 dan P7****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 30%	4	3.50	14.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 7.5%	4	5.50	22.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P4 dan P8****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 30%	4	3.50	14.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 5%	4	5.50	22.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P4 dan P9****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 30%	4	3.38	13.50
Tran_Diamter	Konsentrasi 2.5%	4	5.63	22.50
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	3.500
Wilcoxon W	13.500
Z	-1.307
Asymp. Sig. (2-tailed)	.191
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P4 dan P10****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 30%	4	3.00	12.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.00	24.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P5 dan P6****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 20%	4	3.75	15.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 10%	4	5.25	21.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-.866
Asymp. Sig. (2-tailed)	.386
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.486 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P5 dan P7****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 20%	4	2.75	11.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 7.5%	4	6.25	25.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.021
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



**Uji Mann Whitney P5 dan P8****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tran_Diamter	Konsentrasi 20%	4	2.50	10.00
	Konsentrasi 5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P5 dan P9****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Tran_Diamter	Konsentrasi 20%	4	2.50	10.00
	Konsentrasi 2.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P5 dan P10**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 20%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P6 dan P7**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 10%	4	3.00	12.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 7.5%	4	6.00	24.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P6 dan P8**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 10%	4	3.00	12.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 5%	4	6.00	24.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.732
Asymp. Sig. (2-tailed)	.083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P6 dan P9**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 10%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 2.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P6 dan P10**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 10%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P7 dan P8**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 7.5%	4	4.13	16.50
Tran_Diamter	Konsentrasi 5%	4	4.88	19.50
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	6.500
Wilcoxon W	16.500
Z	-.436
Asymp. Sig. (2-tailed)	.663
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P7 dan P9**

**Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 7.5%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 2.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P7 dan P10**

**Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 7.5%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P8 dan P9****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 5%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Konsentrasi 2.5%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P8 dan P10****Ranks**

	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 5%	4	2.50	10.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

**Uji Mann Whitney P9 dan P10**

Ranks				
	Konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	Konsentrasi 2.5%	4	3.00	12.00
Tran_Diamter	Kontrol Negatif	4	6.00	24.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	Tran_Diamter
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.