

KK
TKD.32/05
SE
K

TESIS

**KAJIAN AKTIVITAS TANIN DENGAN PENISILIN TERHADAP
BAKTERI *Streptococcus pyogenes* DAN *Pasteurella multocida* SECARA IN
VITRO**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

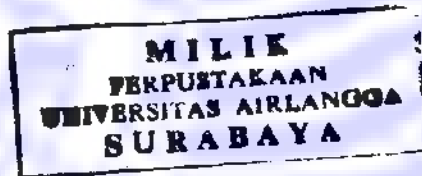
DHARWIN SISWANTORO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

TESIS

**KAJIAN AKTIVITAS TANIN DENGAN PENISILIN TERHADAP
BAKTERI *Streptococcus pyogenes* DAN *Pasteurella multocida* SECARA *IN*
*VITRO***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



**DHARWIN SISWANTORO
NIM. 090114230 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

Lembar Pengesahan

**TESIS TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL, 25 Pebruari 2005**

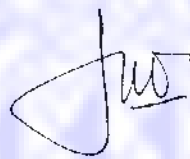
Oleh :

Pembimbing Ketua



Dr. dr.H. Eddy Bagus Wasito, MS., SpMK
NIP. 130 676 011

Pembimbing



Drh. Didik Handijatno, MS.
NIP. 130 933 208

**KAJIAN AKTIVITAS TANIN DENGAN PENISILIN TERHADAP
BAKTERI *Streptococcus pyogenes* DAN *Pasteurella multocida* SECARA *IN*
*VITRO***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

Oleh :

**DHARWIN SISWANTORO
NIM. 090114230 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

Penetapan Panitia Penguji Tesis

Telah diuji pada
Pada tanggal, 17 Maret 2005

PANITIA PENGUJI TESIS:

1. Prof. Kuntoro, dr, MPII, Dr. PH. (Ketua)
2. Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK
3. Setio Harsono, dr, MS, SpMK
4. Drh. Didik Handijatno, MS
5. Ratna Sofaria Munir, dr, MS, AFK.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, segala puji dan syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT, karena hanya dengan Rahmat dan izin-Nya jualah sehingga tesis yang berjudul "Kajian Aktivitas Tanin dengan Penisilin Terhadap Bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* Secara *In Vitro*", dapat diselesaikan dengan baik. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan orang Islam, Rosululloh Muhammad SAW, para sahabat, keluarga serta pengikutnya yang setia sampai akhir jaman.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Bapak Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr. MS., Sp.MK, selaku pembimbing ketua sekaligus Dosen saya selama kuliah di Mikrobiologi dan sebagai Ketua Minat Mikrobiologi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Unair, beliau dengan sabar dan penuh perhatian membimbing, memotivasi, memberi saran dan meluangkan waktu setiap saya perlukan mulai dari penyusunan proposal hingga penulisan tesis ini selesai.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Bapak Drh. Didik Handijatno, MS, selaku Pembimbing yang selalu meluangkan waktu bila saya perlukan, memberi perhatian, motivasi, bimbingan dan saran, mulai dari penyusunan proposal hingga penyelesaian tesis ini.

Kami ucapkan terima kasih juga yang sebesar-besarnya kepada Prof. Kuntoro, dr, MPH, Dr.PH selaku konsultan metodologi dan statistik yang telah membantu serta memberikan masukan dalam rangka penyelesaian tesis ini. Serta kepada panitia

penguji, Ibu dr. Ratna Sofaria Munir, MS. AFK. dan Bapak Setio Harsono, dr, MS, SpMK, saya ucapkan banyak terima kasih yang sedalam-dalamnya di tengah kesibukan beliau-beliau, dengan sabar membimbing, memotivasi dan memasukkan saran, selama penulisan proposal hingga penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih tak lupa saya sampaikan kepada :

1. Rektor Unair Prof. Dr. Med., dr., Puruhito, SpB.,TKV., atas kesempatan yang diberikan dan fasilitas yang disediakan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan pada Program Magister di Unair.
2. Direktur Program Pascasarjana Unair, Prof Dr. dr. H. Muhammad Amin, SpP., dan seluruh stafnya, yang telah menerima dan memberikan kesempatan kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Unair, Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar (IKD).
3. Ketua Program Studi IKD, Prof. Retno Handajani, dr., MS., Ph.D, telah banyak membantu selama saya mengikuti pendidikan di Pascasarjana Unair.
4. Seluruh Dosen Minat Mikrobiologi, dan Dosen pada Program Pascasarjana Unair, yang telah mengajar, membimbing, memotivasi saya selama mengikuti kuliah.
5. Kepala Laboratorium PMPP Pusvetma dan stafnya yang telah banyak membantu menyediakan fasilitas sehubungan dengan penelitian ini.
6. Direktur Politeknik Negeri Jember, Ketua Jurusan Peternakan beserta staf tempat saya bekerja, yang telah memberikan izin dan motivasi buat saya untuk melanjutkan studi pada Program Magister Pascasarjana Unair Surabaya.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang tulus saya sampaikan kepada Ibu Drh.Ernawati Yulia dan Ibu Endah, staf laboratorium PMPP di Pusvetma yang

dengan segala pengorbanannya meluangkan waktu, membantu dan mendampingi saya selama penelitian berlangsung.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada orang tua tercinta Ayahanda Saikun (Alm), yang telah mengasuh, membiayai, membimbing hingga menjadi anak yang berguna, mendo'akan keberhasilan saya, yang tidak sempat menyaksikan keberhasilan saya dan Ibunda Sulasih. Pada kakakku Ir. Juwitarini dan Dwi Suryanto, ST, juga kakak iparku Drs. Didik Susanto dan Sri Ningsih serta keponakanku yang lucu Rindiantika Prameswari (Tika), Widya Sekar Arum (Arum), Kamilia Zulfaida (Lia) dan Muhamad Yudho Ardianto yang telah banyak memotivasi dan memberi bantuan baik moril maupun materiil.

Kepada teman-teman seminat studi angkatan tahun 2001:

Bambang Susilo, dr., MKes, Sp.MK., Dewi Santosaningsih, dr., MKes., Rosmelati Situmeang, drh., MKes., Yunita Arliny, dr., MKes., Retno Budiarti, dr., MKes., Indira, drg., MKes., Ahmad Muhlisin, S.Pd, MKes., Erni Yohani Mahtuti, S.Pd, MKes., Laksmin Kadir S.Pd, MKes., Dra. Nikmah Madjid, MKes., dan Atik, drg., MKes, atas kerjasama yang baik selama kuliah yang tidak akan saya lupakan selamanya, terima kasih semuanya.

Kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah membantu selama masa pendidikan Program Magister di Unair, saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya.

Akhirnya saya menyampaikan permohonan maaf atas segala kesalahan dan kckhilafan selama mengikuti pendidikan pada Program Magister di Unair. Semoga Alloh SWT senantiasa melimpahkan rahmat dan perlindungan-Nya kepada kita semua, Amin.

RINGKASAN

KAJIAN AKTIVITAS TANIN DENGAN PENISILIN TERHADAP BAKTERI *Streptococcus pyogenes* DAN *Pasteurella multocida* SECARA *IN VITRO*

Dharwin Siswantoro

Di negara berkembang termasuk Indonesia penyakit infeksi dan zoonosis menduduki tempat yang penting. Zoonosis merupakan penyakit yang ditularkan dari hewan ke manusia dan atau sebaliknya. Salah satu penyebab penyakit infeksi dan zoonosis adalah bakteri, termasuk diantaranya bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida*. Bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah merupakan salah satu penyebab infeksi lokal pada kulit yang dapat menyerang hewan dan manusia. Bakteri gram positif ini termasuk dalam kelompok *Streptococcus β haemolyticus* golongan A yang merupakan kelompok besar patogen pada manusia. Sedangkan bakteri *Pasteurella multocida* bersifat gram negatif, merupakan penyebab infeksi sistem pernapasan suppuratif, khususnya pada petani dan orang-orang yang hidup di daerah pedalaman yang secara tertutup dekat dengan binatang. Untuk menghambat atau membunuh bakteri-bakteri tersebut dapat digunakan antibakteri misalnya antibiotika. Permasalahan dalam terapi antibiotika pada penyakit infeksi adalah beraneka ragamnya etiologi penyakit baik oleh bakteri gram positif maupun negatif, sementara tidak semua antibiotik berspektrum luas, sehingga tidak bisa membunuh semua bakteri tersebut, dan sulitnya menentukan jenis antibiotika yang tepat, hal ini disebabkan karena mikroba semakin resisten terhadap antibiotika akibat pemakaiannya yang tidak tepat. Sementara itu banyak tanaman obat tradisional mengandung antibakteri.

Obat tradisional merupakan suatu warisan budaya bangsa yang sudah lama dikenal sebelum adanya dokter dan sampai sekarang pemakaiannya masih cukup luas. Berkat perkembangan ilmu pengetahuan melalui analisis kimia dan uji bio assay dari suatu tumbuhan obat, maka dapat diperoleh informasi tentang kandungan zat berkhasiat serta efek farmakologisnya. Salah satu zat aktif dari tanaman yang sudah diisolasi adalah tanin atau asam tanat. Tanin mempunyai efek fisiologis dan efek farmakologis karena kemampuannya untuk membentuk kompleks, baik dengan protein maupun polisakarida. Pembentukan kompleks itu berdasarkan pada pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik antara tanin (golongan polifenol) dengan protein. Kemampuan antimikroba dari senyawa tanin berdasarkan pada kemampuan senyawa ini menghambat kerja enzim tertentu secara selektif atau kemampuannya dalam menghambat ikatan antar ligan dengan suatu reseptor.

Ada kemungkinan tanin yang merupakan zat kimia yang sebagian besar tersebar dalam tanaman ini mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri dan sintesis protein sel kuman gram positif maupun gram negatif. Sehingga perlu diteliti aktifitas senyawa tanin terhadap kuman gram positif (*Streptococcus pyogenes*)

maupun gram negatif (*Pasteurella multocida*). Sebagai perbandingan daya hambat terhadap kuman, senyawa tanin dibandingkan dengan penisilin, yang merupakan salah satu antibiotik bersifat menghambat sintesis dinding sel mikroba, yang sensitif terhadap kedua kuman uji.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari senyawa tanin terhadap pertumbuhan kuman *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* jika dibandingkan dengan antibiotik penisilin secara *in vitro*.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental sesungguhnya dengan Rancangan Faktorial. Teknik yang digunakan adalah dengan metode dilusi yang selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* untuk membandingkan dua perlakuan obat antibakteri yaitu tanin dan penisilin dengan konsentrasi yaitu 1000 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62.5 $\mu\text{g/ml}$; 32 $\mu\text{g/ml}$ dan 16 $\mu\text{g/ml}$. Perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali, baik untuk perlakuan tanin maupun penisilin. Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik dengan analisis varian dua faktor (*Two-way Anova*) dengan tingkat kepercayaan 5%, Jika diperoleh hasil mempunyai efek yang bermakna (signifikan) antar perlakuan ($F_{II} > F_T$) berarti H_A diterima, selanjutnya akan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan LSD untuk mengetahui perlakuan mana yang aktivitas antibakterinya lebih bermakna atau lebih kuat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna diantara dua bakteri uji, diantara dua bahan uji, dan diantara berbagai dosis konsentrasi, dimana F hitung $> F$ tabel 5%, sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima yang berarti bahwa ketiganya memberikan pengaruh sangat bermakna secara *in vitro*. Berdasar uji statistik dan uji lanjutan dengan LSD ternyata diantara kedua bakteri uji, baik dengan bahan tanin maupun penisilin memberikan pengaruh yang lebih baik pada bakteri *Streptococcus pyogenes* jika dibandingkan dengan bakteri *Pasteurella multocida*. Sedangkan perlakuan dengan bahan penisilin memberikan pengaruh lebih baik dibanding dengan tanin pada kedua bakteri uji. Perlakuan dengan tanin pada kedua bakteri uji dan penisilin pada bakteri *Pasteurella multocida* dengan dosis terendah yang masih dapat membunuh bakteri yaitu 62,5 $\mu\text{g/ml}$, yang tidak bermakna terhadap dosis 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$, dan bermakna terhadap dosis 32 $\mu\text{g/ml}$; 16 $\mu\text{g/ml}$; 8 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan perlakuan dengan penisilin pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan dosis terendah yang masih dapat membunuh bakteri yaitu 32 $\mu\text{g/ml}$, yang tidak bermakna terhadap dosis 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$, dan bermakna terhadap dosis 16 $\mu\text{g/ml}$; 8 $\mu\text{g/ml}$.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tanin dapat digunakan untuk membunuh bakteri baik pada *Streptococcus pyogenes* maupun *Pasteurella multocida* secara *in vitro*, tetapi jika dibandingkan dengan penisilin, masih lebih baik penisilin dalam membunuh kedua bakteri uji. Aktifitas kedua bahan uji baik tanin maupun penisilin lebih kuat pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dibanding bakteri *Pasteurella multocida* secara *in vitro*.

SUMMARY

A STUDY OF TANIN ACTIVITIES WITH PENICILLIN ON *Streptococcus pyogenes* AND *Pasteurella multocida* BACTERIA IN VITRO

Dharwin Siswantoro

In developing countries including Indonesia, infectious diseases and zoonosis are prevalent. Zoonosis is a disease spread from animals to human and vice versa. One of the cause of infectious diseases and zoonosis is bacteria, including *Streptococcus pyogenes* and *Pasteurella multocida*. *Streptococcus pyogenes* is one of bacteria that caused local infection on skin that can attack animals and human. *Streptococcus pyogenes* is one of the members of positive gram bacteria. This bacteria belongs to the A class of *Streptococcus β haemolyticus* group which constitutes the big pathogenic groups in human. While *Pasteurella multocida* is a negative gram bacteria, which caused suppurative respiration system infection, especially on farmers and people who lived in hinterland area that closely close with animals. Anti bacteria such as antibiotic can be used to hamper or kill those bacteria. The problems in antibiotic therapies on infectious diseases are the varied of disease etiologies either by positive or negative gram bacteria, while not all of antibiotic had wide spectrum, so that it cannot kill all of those bacteria, and the difficulty of deciding the right antibiotic, this is because microbe is getting resistance to antibiotic because of the incorrect usage. Meanwhile there are a lot of traditional medicines that contain anti bacteria.

Traditional medicines are the nation cultural inheritance that has been known long ago before the presence of doctors and until now their usage is still wide. Thanks to science development through chemical analysis and bio assay test from a drug plant, then the information about its efficacious substance content and pharmacologic effect can be known. One of the active substances in plant that has been isolated are tanin and tanat acid. Tanin has physiologic and pharmacologic effect because of its ability to form complexes, either by protein or polisaccharide. This complex formation is based on hydrogen bound formation and hidrofobe interaction between tanin (polifenol group) with protein. Anti microbe ability from tanin compound is based on this compound ability in hampering the bound between ligan with a receptor.

There is a possibility that tanin which constitutes a chemical substance mostly spread in this plant able to hamper the synthesis of bacteria cell wall and protein synthesis of positive or negative gram microbe cell. So that tanin compound activity to the positive (*Streptococcus pyogenes*) or negative (*Pasteurella multocida*) gram microbe cell is needed to be examined. As the comparison of hampering power to microbe, tanin compound compared to penicillin, which constitutes one of the antibiotic that has the characteristic of hampering microbe cell wall synthesis, that is sensitive to these two of microbe tests.

This research is intended to find out antibacteria activities from tanin compound on bacteria growth of *Streptococcus pyogenes* and *Pasteurella multocida* compared with penicillin antibiotics *in vitro*.

The type of the research is experimental with Factorial Design. The technique used was dilution method which was followed by counting the bacterial colony of *Streptococcus pyogenes* and *Pasteurella multocida* to compare the two treatments using antibacteria medicine namely tanin and penicillin with the concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$; 32 $\mu\text{g/ml}$; and 16 $\mu\text{g/ml}$. The treatment were repeated four times, both for tanin or penicillin. The data obtained was then analyzed statistically using *two - way Anova* variant analysis with level of reliability 5%. If the result had significant effect between the treatments ($F_H > F_T$) it means H_A was accepted, which was later followed by a further test using LSD to find out which treatment whose antibacteria activities were more significant or stronger.

The result of the research shows that there is a significant difference between the two test bacteria, between the two test objects, and between the various concentrations dosage, $F_{\text{hitung}} > F_{\text{table}} 5\%$, so H_0 was rejected and H_1 accepted which means that all three gave a significant effect *in vitro*. Based on statistical test and post hoc test using LSD between both tested bacteria either tanin or penicillin gave a better effect on *Streptococcus pyogenes* compared to *Pasteurella multocida*. While the treatment using penicillin gave a better effect compared to tanin or both tested bacteria. The treatment with tanin on both tested bacteria and penicillin on *Pasteurella multocida* bacteria with the lowest dosage which is still able to kill bacteria that is 62,5 $\mu\text{g/ml}$, which was not significant for the dosage 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$, and significant for the dosage 32 $\mu\text{g/ml}$; 16 $\mu\text{g/ml}$; 8 $\mu\text{g/ml}$, whereas the treatment of penicillin on *Streptococcus pyogenes* bacteria with the lowest dosage which is still able to kill bacteria that is 32 $\mu\text{g/ml}$, which was not significant for the dosage of 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$ and significant for the dosage of 16 $\mu\text{g/ml}$; 8 $\mu\text{g/ml}$.

From the research results can be concluded that tanin can be used to kill bacteria either for *Streptococcus pyogenes* or *Pasteurella multocida* in a *in vitro* manner, but if compared with penicillin, penicillin is better in killing those two test microbes. Activities in those two test materials either tanin or penicillin is stronger in *Streptococcus pyogenes* bacteria compared with *Pasteurella multocida* in a *in vitro* manner.

ABSTRACT

A STUDY OF TANIN ACTIVITIES WITH PENICILLIN ON *Streptococcus pyogenes* AND *Pasteurella multocida* BACTERIA *IN VITRO*

Dharwin Siswantoro

This research is intended to find out antibacteria activities from tanin compound on bacteria growth of *Streptococcus pyogenes* and *Pasteurella multocida* compared with penicillin antibiotics *in vitro*.

The type of the research is experimental with Factorial Design. The technique used was dilution method which was followed by counting the bacterial colony of *Streptococcus pyogenes* and *Pasteurella multocida* to compare the two treatments using antibacteria medicine namely tanin and penicillin with the concentration of 1000 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$; 32 $\mu\text{g/ml}$; and 16 $\mu\text{g/ml}$. The treatment were repeated four times, both for tanin or penicillin. The data obtained was then analyzed statistically using *two – way Anova* variant analysis with level of reliability 5%. If the result had significant effect between the treatments ($F_{it} > F_T$) it means H_A was accepted, which was later followed by a further test using LSD to find out which treatment whose antibacteria activities were more significant or stronger.

The result of the research shows that there is a significant difference between the two test bacteria, between the two test objects, and between the various concentrations dosage, $F_{hitung} > F_{table}$ 5%, so H_0 was rejected and H_1 accepted which means that all three gave a significant effect *in vitro*. Based on statistical test and post hoc test using LSD between both tested bacteria either tanin or penicillin gave a better effect on *Streptococcus pyogenes* compared to *Pasteurella multocida*. While the treatment using penicillin gave a better effect compared to tanin or both tested bacteria. The treatment with tanin on both tested bacteria and penicillin on *Pasteurella multocida* bacteria with the lowest dosage which is still able to kill bacteria that is 62,5 $\mu\text{g/ml}$, which was not significant for the dosage 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$, and significant for the dosage 32 $\mu\text{g/ml}$; 16 $\mu\text{g/ml}$; 8 $\mu\text{g/ml}$, whereas the treatment of penicillin on *Streptococcus pyogenes* bacteria with the lowest dosage which is still able to kill bacteria that is 32 $\mu\text{g/ml}$, which was not significant for the dosage of 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$ and significant for the dosage of 16 $\mu\text{g/ml}$; 8 $\mu\text{g/ml}$.

Key words : tanin , penicillin, antibacteria, *in vitro*

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR.....	iii
PERSETUJUAN	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
ABSTRACT	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR GRAFIK	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Tanin	7
2.2. Penisilin.....	11
2.3. <i>Streptococcus pyogenes</i>	13
2.4. <i>Pasteurella multocida</i>	17
2.5. Cara Penentuan Aktifitas Antibakteri.....	21

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
PENELITIAN	25
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	25
3.2. Hipotesis Penelitian	27
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	28
4.1. Rancangan Penelitian	28
4.2. Sampel Penelitian	32
4.3. Variabel Penelitian	32
4.4. Bahan Penelitian.....	35
4.5. Instrumen Penelitian.....	35
4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian.....	35
4.7. Prosedur Kerja	36
4.8. Analisis Data	42
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	43
5.1 Data Penelitian.....	43
5.2 Analisis Statistik.....	47
BAB 6 PEMBAHASAN	51
BAB 7 PENUTUP	63
7.1 Kesimpulan.....	63
7.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 : <i>Mc Farland Nephelometer Standards</i>	37
Tabel 5.1 : Data Jumlah Koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> dan <i>Pasteurella multocida</i> Berbagai Konsentrasi Tanin dan Penisilin	44
Tabel 5.2 : Data Jumlah Koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> dan <i>Pasteurella multocida</i> Sebelum Pemberian Tanin dan Penisilin ($\mu\text{g/ml}$) Sebagai Kontrol Negatif	45
Tabel 5.3 : Hasil Uji Sidik Ragam Rancangan Faktorial dengan $\alpha=0,05$	47
Tabel 5.4 : Hasil Uji Statistik (t - test) Jumlah Koloni Sebelum (kontrol) dan Sesudah Perlakuan	48
Tabel 6.1 : Struktur polimer dinding sel bakteri	53

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Hasil Hidrolisa Tanin	8
Gambar 2.2 : Struktur Umum Senyawa Tanin Terhidrolisa	9
Gambar 3.1 : Bagan Kerangka Konseptual Penelitian.....	27
Gambar 4.1 : Prosedur <i>Tube Dilution Method</i> dengan Bahan Tanin.....	40
Gambar 4.2 : Prosedur <i>Tube Dilution Method</i> dengan Bahan Penisilin	41
Gambar 6.1 : Perbandingan Struktur Selubung Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif.....	52
Gambar 6.2 : Dinding sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif	54
Gambar 6.3 : Gambar Molekular dari Selubung Bakteri Gram Negatif	56

DAFTAR GRAFIK

Grafik 5.1 : Perbandingan Jumlah Koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> Setelah Perlakuan dengan Tanin dan Penisilin	46
Grafik 5.2 : Perbandingan Jumlah Koloni <i>Pasteurella multocida</i> Setelah Perlakuan dengan Tanin dan Penisilin	46
Grafik 5.2 : Perbandingan Jumlah Koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> dan <i>Pasteurella multocida</i> Setelah Perlakuan dengan Tanin dan Penisilin.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Data Hasil Penelitian	68
Lampiran 2 : Hasil Analisis Statistik	71



BAB 1
PENDAHULUAN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

1.1. Latar belakang masalah.

Di negara berkembang termasuk Indonesia penyakit infeksi dan zoonosis menduduki tempat yang penting. Zoonosis merupakan penyakit yang ditularkan dari hewan ke manusia dan atau sebaliknya. Zoonosis juga mencakup keadaan di mana suatu organisme dapat hidup baik di dalam tubuh manusia maupun hewan, meskipun organisme tersebut tidak secara umum ditularkan dari yang satu terhadap lainnya. Penyakit ini sangat merugikan karena disamping membahayakan kesehatan manusia juga menimbulkan kerugian secara ekonomis terutama dibidang peternakan. Salah satu penyebab penyakit infeksi dan zoonosis adalah bakteri, termasuk diantaranya bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* (Joklik *et al.*, 1992; Soedarto, 2003).

Bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah merupakan salah satu penyebab infeksi lokal pada kulit yang dapat menyerang hewan dan manusia (Joklik *et al.*, 1992). Bakteri *Streptococcus pyogenes* merupakan salah satu anggota bakteri gram positif. Bakteri ini termasuk dalam kelompok *Streptococcus β haemolyticus* golongan A yang merupakan kelompok besar patogen pada manusia. Bakteri ini berhubungan dengan infeksi lokal atau sistemik dan gangguan imunologis pasca infeksi streptokokus (Jawetz *et al.*, 1996). Pada ternak *S.pyogenes* dapat menyebabkan infeksi neonatal; bakteri ini juga ditemukan pada ternak penderita mastitis (Radostits

Sedangkan bakteri *Pasteurella multocida* bersifat gram negatif, merupakan penyebab infeksi sistem pernapasan suppuratif, khususnya pada petani dan orang-orang yang hidup didaerah pedalaman yang secara tertutup dekat dengan binatang (Anonimus, 1980; Joklik *et al.*, 1992). Pada ternak, bakteri *Pasteurella multocida* dapat menyebabkan penyakit Septicemia Epizootica, yaitu penyakit menular pada kerbau, sapi, dan kadang-kadang pada domba, kambing dan kuda; Penyakit Fowl Cholera yang merupakan penyakit kontagious yang menyerang unggas dan bangsa burung lainnya (Anonimus, 1980). Infeksi pada manusia oleh bakteri *P. multocida* akan memperlihatkan berbagai gejala sinusitis, bronchiectasis, peritonitis, pneumonia, abses paru, osteomyelitis dan septicaemia (Davis *et al.*, 1990; Joklik *et al.*, 1992). Untuk menghambat atau membunuh bakteri-bakteri tersebut dapat digunakan antibakteri misalnya antibiotika. Permasalahan dalam terapi antibiotika pada penyakit infeksi adalah beraneka ragamnya etiologi penyakit baik oleh bakteri gram positif maupun negatif, sementara tidak semua antibiotik berspektrum luas, sehingga tidak bisa membunuh semua bakteri tersebut, dan sulitnya menentukan jenis antibiotika yang tepat, hal ini disebabkan karena mikroba semakin resisten terhadap antibiotika akibat pemakaiannya yang tidak tepat (Soetanto, dkk., 2001). Sementara itu banyak tanaman obat tradisional mengandung antibakteri.

Obat tradisional merupakan suatu warisan budaya bangsa yang sudah lama dikenal sebelum adanya dokter dan sampai sekarang pemakaiannya masih cukup luas. Selama ini penggunaannya didasarkan pada pengalaman (empirik) turun temurun, tanpa ada data ilmiah yang mendukung baik terhadap khasiat maupun cara penggunaannya. Namun berkat perkembangan ilmu pengetahuan melalui analisis

kimia dan uji bio assay dari suatu tumbuhan obat, maka dapat diperoleh informasi tentang kandungan zat berkhasiat serta efek farmakologisnya. Salah satu zat aktif dari tanaman yang sudah diisolasi adalah tanin atau asam tanat. Tanin yang sudah terisolasi dapat dijumpai di pasaran, berupa bubuk atau serbuk putih kekuningan, amorf, rasa astringent dan aroma khas. Asam tanat biasanya mengandung H₂O 10% merupakan sekelompok senyawa kompleks yang sebagian besar tersebar luas dalam tumbuhan. Hampir semua suku dari tumbuhan mempunyai jenis-jenis yang mengandung tanin. Istilah tanin ini pertama kali digunakan tahun 1976 untuk menyatakan senyawa yang ada dalam ekstrak tumbuhan yang mampu bereaksi dengan kulit hewan sehingga membentuk kulit yang masak. Tanin umumnya tersimpan pada bagian daun, buah muda, kulit batang dan yang terbanyak pada sel mati atau mengering (Trease and Evans, 1978).

Tanin dinamakan juga *asam tanat* dan *asam galotanat*, ada yang tidak berwarna tetapi ada juga yang berwarna kuning atau coklat. *Asam tanat* mempunyai berat molekul 1.701. Tanin terdiri dari sembilan molekul *asam galat* dan molekul *glukosa* (Harborne, 1994). Oleh Winarno dalam Harismah (2002) dinyatakan istilah tanin yang dipakai ahli pangan ada dua yakni tanin terkondensasi (*condensed tannin*) dan tanin terhidrolisasi (*hydrolized tannin*). Penelitian menunjukkan terhadap daun jambu biji kering yang digiling halus mengandung tanin sampai 17,40%. Makin halus serbuk daun, makin tinggi kandungan taninnya. Tanin dapat digunakan sebagai astringent, baik untuk saluran pencernaan, maupun kulit. Selain itu tanin juga dapat digunakan sebagai obat antidiare. Tanin dalam bentuk suppositoria bisa digunakan untuk pengobatan hemorrhoid (Reynolds and Martindale, 1996). Menurut Cannell

(1998) tanin dapat menghambat kerja enzim topoisomerase I dan II (T1 dan T2), *viral reverse transkriptase* (RT) pada konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/ml}$.

Menurut Haslam, *et al.* (1989) tanin mempunyai efek fisiologis dan efek farmakologis karena kemampuannya untuk membentuk kompleks, baik dengan protein maupun polisakarida. Pembentukan kompleks itu berdasarkan pada pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik antara tanin (golongan polifenol) dengan protein. Kemampuan antimikroba dari senyawa tanin berdasarkan pada kemampuan senyawa ini menghambat kerja enzim tertentu secara selektif atau kemampuannya dalam menghambat ikatan antar ligan dengan suatu reseptor. Rohman (1997) berpendapat bahwa isolat aktif asam tanat ini dapat digunakan untuk menghambat *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans* masing-masing dengan konsentrasi 62,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 125 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan Mahtuti (2003) berdasarkan penelitiannya berpendapat bahwa konsentrasi 125 $\mu\text{g/ml}$ asam tanat bersifat bakterisidal terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

Berdasarkan latar belakang tersebut, ada kemungkinan tanin yang merupakan zat kimia yang sebagian besar tersebar dalam tanaman ini mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri dan sintesis protein sel bakteri gram positif maupun gram negatif. Sehingga perlu diteliti aktifitas senyawa tanin terhadap bakteri gram positif (*Streptococcus pyogenes*) maupun gram negatif (*Pasteurella multocida*). Sebagai perbandingan daya hambat terhadap kuman, senyawa tanin dibandingkan dengan penisilin, yang merupakan salah satu antibiotik bersifat menghambat sintesis dinding sel mikroba, yang sensitif terhadap kedua bakteri uji.

1.2. Rumusan masalah

Apakah terdapat perbedaan pengaruh dengan berbagai macam konsentrasi antara tanin dan penisilin terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* secara *in vitro* ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari senyawa tanin terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* jika dibandingkan dengan antibiotik penisilin secara *in vitro*.

1.3.2.1. Tujuan Khusus:

Mengetahui bahwa terdapat perbedaan pengaruh berbagai macam konsentrasi antara tanin dan penisilin dalam menurunkan jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* secara *in vitro*.

1.4. Manfaat Penelitian.

1.4.1. Memberikan informasi pada kalangan pengusaha obat tradisional maupun peternak tentang manfaat tanin komersial yang ada di pasaran, yang dapat diisolasi dari tanaman di sekitar kita seperti tanaman jambu biji.

1.4.2. Menunjang perkembangan ilmu kedokteran khususnya dalam hubungannya dengan penanggulangan/pengobatan penyakit zoonosis dan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri.

- 1.4.3. Memberikan informasi ilmiah mengenai aktifitas atau potensi tanin sebagai senyawa antimikroba alternatif terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanin

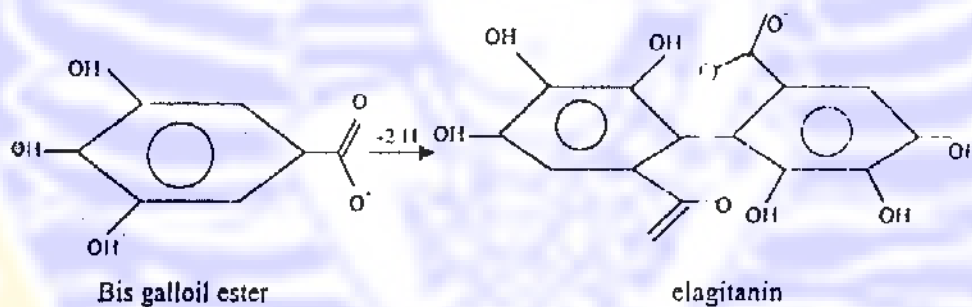
Tanin dinamakan juga *asam tanat* atau *asam galatонат*, ada yang tidak berwarna tetapi ada juga yang berwarna kuning atau coklat. Asam tanat mempunyai berat molekul 1.701. Tanin terdiri dari sembilan molekul asam galat dan molekul glukosa (Harborne, 1994)

Menurut Cannel (1998) tanin umumnya adalah polifenol yang ditemukan dalam ekstrak tumbuhan, seringkali dalam konsentrasi yang tinggi. Tanin tumbuhan (*plant polyphenol*) dibedakan strukturnya dalam 2 group namanya polyester dasar dalam asam gallic atau hexahydroxydiphenic acid dan derivatnya (disebut juga *tanin hidrolisis*); dan proantocyanidins (*tanin condensed*). Senyawa diekstraksi menggunakan senyawa polar hingga dapat terlarut. Ekstrak organik yang mengandung tanin dapat menghambat kerja enzim topoisomerase 1 dan 2 (T-1 dan T-2), *viral reverse transkriptase* (RT).

Reynold and Martindale (1996) berpendapat bahwa tanin yang dijual di pasaran biasanya mengandung H₂O 10%, merupakan serbuk putih kekuningan, amorf, warna agak gelap, astringent dan aroma khas. Tanin sangat larut dalam air, alkohol dan acetone; larut dalam glycerol 1:1; tidak larut dalam chloroform, ether dan minyak spiritus. Secara kimia tanin merupakan senyawa kompleks dan biasanya terdapat sebagai campuran polifenol yang sulit dipisahkan karena tidak dapat

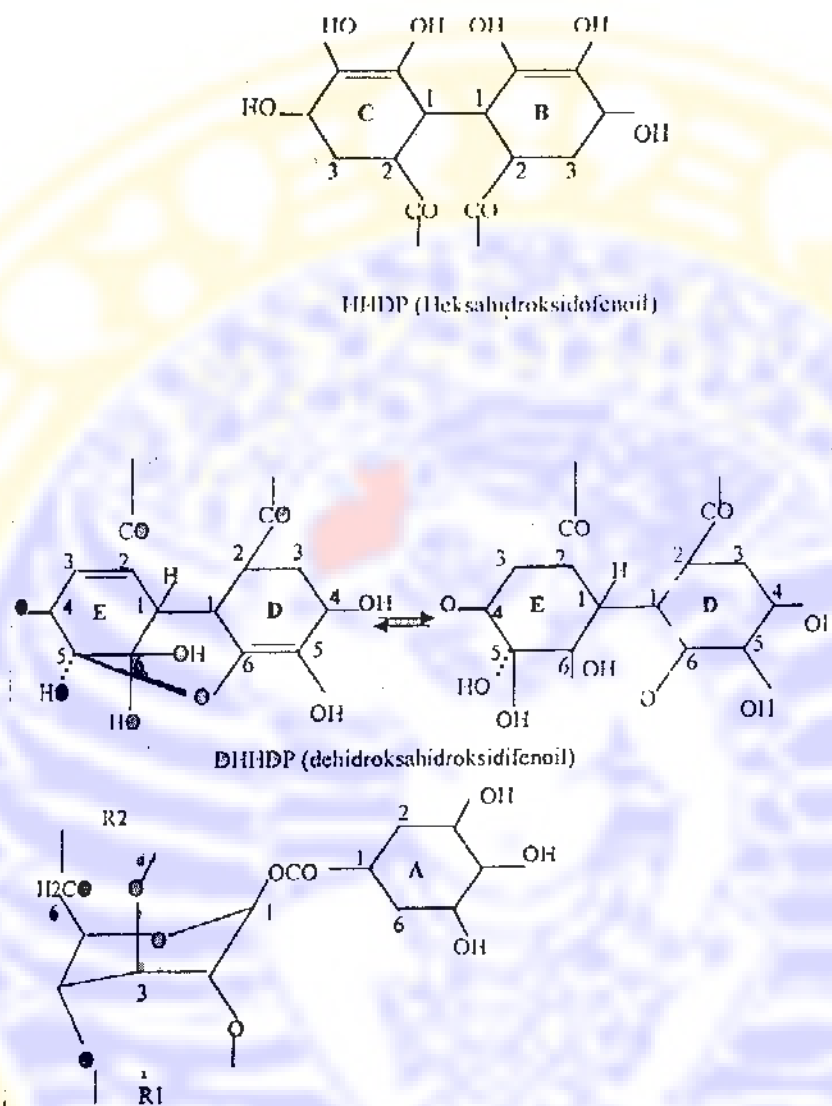
dikristalkan. Meskipun demikian dengan berkembangnya teknik kromatografi memungkinkan untuk mengidentifikasi polifenol sederhana dalam tanin.

Tanin yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanin terhidrolisa (*Hydrolyzable tanin*). Golongan ini merupakan konjugat dan monosakarida, umumnya D-glukosa, di mana gugus hidroksilnya semua atau sebagian membentuk ikatan ester dengan asam galat, elegat, digalat, trigalat dan asam heksa hidroksidifenat. Tanin terhidrolisa juga disebut piragalol tanin, karena pada oksidasi kering asam galat dan turunannya diubah menjadi piragalol (Trease and Evans, 1978). Senyawa tanin golongan ini berbentuk amorf kuning, coklat, larut dalam air panas membentuk dispersi koloidal. Atas dasar residu asamnya, tanin terhidrolisa dibedakan atas *gallotanin* dan *elagitanin*. Pada hidrolisa tanin membentuk asam galat sedangkan elagitanin membentuk elegat (Haslam, 1996).



Gambar 2.1. Hasil Hidrolisa Tanin (Haslam, 1996).

Senyawa aktif di dalam tanin merupakan senyawa ester galoil yang mengandung gugus HHDP (heksahidroksidifenoil) dan gugus DHHP (dehidroheksahidroksi difenoil) (Rohman, 1997).



Gambar 2.2 Struktur Umum Senyawa Tanin Terhidrolisa (Rohman, 1997)

2.1.1. Manfaat Tanin

Menurut Ma'at dalam Harismah (2002) daun jambu biji yang mengandung tanin dapat digunakan sebagai obat antidiare. Di samping itu tanin daun jambu biji dapat digunakan untuk membuat warna coklat makanan dan kain.

Tanin dapat juga digunakan sebagai astringent (menciutkan lapisan permukaan usus), baik untuk saluran pencernaan, maupun kulit. Selain itu tanin dapat digunakan sebagai antidiare, dalam bentuk suppositoria dapat digunakan untuk pengobatan hemorrhoid (Reynold and Martindale, 1996). Tanin dapat berkombinasi dengan protein yang mengakibatkan tanin tahan terhadap enzim pemecah protein, karena protein dapat diendapkan olehnya.

Disamping itu tanin dapat juga digunakan sebagai antidotum terutama keracunan alkaloid. Menurut Tyler (1988); penggunaan tanin bagi metabolisme tumbuhan adalah sebagai sumber energi pada proses penebaran buah, di mana energi diperoleh dengan mengoksidasi tanin; sebagai sumber asam buah; mencegah kerusakan yang disebabkan oleh serangga atau jamur.

2.1.2 Aktivitas Senyawa Tanin terhadap Mikroba

Hara dalam Harismah (2002) menyatakan senyawa tannin dapat dipakai sebagai antimikroba (bakteri dan virus), sifat antimikroba disebabkan oleh terdapatnya gugus pirogalol dan gugus galolil sedangkan sifat penghambatan terhadap racun ditentukan oleh struktur tersier persenyawaan gugus katekol atau pirogalol dengan gugus galoilnya.

Tanin merupakan polifenol yang ditemukan pada tumbuhan, sehingga aktivitas yang ditimbulkan tanin kemungkinan sama dengan pengaruh dari polifenol terhadap bakteri. Efek fisiologis dan efek farmakologis dari golongan polifenol disebabkan oleh kemampuannya untuk membentuk senyawa kompleks, baik dengan protein maupun polisakarida.

Pembentukan senyawa kompleks antara polifenol dengan protein berdasarkan pada pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik antara polifenol dengan protein. Kemampuan membentuk senyawa kompleks dengan protein sangat tinggi karena polifenol sebagai ligan multidentat dapat berikatan secara simultan pada beberapa titik di permukaan molekul protein. Ukuran model polifenol juga menentukan kemampuannya untuk berikatan dengan protein. Semakin besar molekulnya semakin besar kemampuannya untuk membentuk ikatan dengan protein (Haslam, *et al.*, 1989).

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa senyawa golongan tanin dapat menghambat beberapa enzim secara selektif dan dilaporkan pula bahwa hasil penelitian 20 senyawa golongan polifenol menunjukkan aktivitas spesifik sampai ke taraf reseptor, yaitu menghambat pembentukan ikatan antara radioligan spesifik dengan 16 reseptor yang diuji dan didapatkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas yang berbeda (Min Zhu, *et al.*, 1997).

Dengan demikian kemampuan antimikroba dari isolat aktif yang berhasil diisolasi diperkirakan berdasarkan pada kemampuan senyawa tanin untuk berikatan dengan protein dan polisakarida; kemampuan senyawa polifenol untuk menghambat enzim tertentu secara selektif atau kemampuannya dalam menghambat ikatan antar ligan dengan suatu reseptor (Rohman, 1997).

2.2. Penisilin

Penisilin merupakan antibiotika golongan betalaktam yang merupakan asam organik, terdiri dari satu inti siklik dengan satu rantai samping. Antibiotika adalah zat yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme terutama fungi, yang dapat menghambat

pertumbuhan atau membunuh bakteri dan mikroorganisme lain. Dalam penggunaan antibiotika harus memiliki sifat toksisitas selektif. Artinya obat tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap mikroorganisme, tetapi relatif tidak toksik terhadap hospesnya. Berdasarkan sifat ini antibiotika dibagi menjadi bakteristatik dan bakterisidik. Antibiotik yang bersifat bakteristatik hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan antibiotika yang bersifat bakterisidik mampu membunuh bakteri (Ganiswara dkk., 1995).

Berdasarkan spektrumnya, antibiotika dibagi menjadi antibiotika berspektrum sempit dan berspektrum luas (Bruner and Gillespie, 1973). Antibiotika dengan spektrum sempit hanya mampu membunuh bakteri Gram positif atau Gram negatif saja. Sedangkan antibiotika dengan spektrum luas dapat membunuh bakteri Gram positif maupun Gram negatif, termasuk Riketsia dan Klamidia (Hagan and Bruner, 1961).

Mekanisme kerja antibiotik dibagi menjadi lima kelompok, yaitu menghambat sintesis dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, menghambat sintesis protein bakteri, mengganggu metabolisme sel bakteri dan menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Ganiswara dkk., 1995).

Penisilin yang digunakan dalam penelitian disini adalah penisilin G (Benzil penisilin) yang merupakan penisilin alam yang bekerja dengan menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel mikroba. Terhadap mikroba yang sensitif, penisilin akan menghasilkan efek bakterisid pada mikroba yang aktif membelah. Mikroba dalam keadaan metabolik tidak aktif (tidak membelah = *persisters*) praktis tidak dipengaruhi oleh penisilin; walaupun ada

pengaruhnya hanya bakteriostatik. Diantara semua penisilin, penisilin G mempunyai aktivitas terbaik terhadap bakteri gram positif yang sensitif (Ganiswara dkk., 1995).

Penisilin G efektif terutama terhadap mikroba gram positif dan *Spirochaeta*, selain itu beberapa mikroba gram negatif juga sangat sensitif terhadap penisilin G misalnya gonokokus yang tidak menghasilkan penisilinase. Juga untuk bakteri uji *P.multocida* yang merupakan gram negatif masih cukup sensitif. Begitu pula dengan bakteri *S.pyogenes* yang merupakan kelompok gram positif, masih sensitif dengan penisilin jenis ini (Ganiswara dkk., 1995; Jawetz *et al.*, 2001).

Efek samping yang ditimbulkan oleh penisilin meliputi reaksi alergi dengan gejala urtikaria, dermatitis, demam serta reaksi anafilaksis. Frekuensi kejadian efek samping bervariasi, tergantung sediaan dan cara pemberian. Pada umumnya pemberian secara oral lebih jarang menimbulkan efek samping daripada pemberian parenteral. Penisilin G biasanya digunakan secara parenteral. Sediaan terdapat dalam bentuk penisilin G larut air untuk suntikan sub kutan, intra muskular, intra vena atau intra tekal, dan penisilin G repositor untuk suntikan intra muskular. (Ganiswara dkk., 1995).

2.3. *Streptococcus pyogenes*

2.3.1. Etiologi

Menurut Bruner and Gillespie (1973), *Streptococcus pyogenes* pertama kali diisolasi dan diidentifikasi oleh Rosenbach pada tahun 1884. *Streptococcus pyogenes* mempunyai sinonim *Streptococcus erysipelatos*, *Streptococcus puerperalis*,

Streptococcus septicus, *Streptococcus articulorum*, dan *Streptococcus haemoliticus* (Merchant and Packer, 1961).

Streptococcus pyogenes merupakan bakteri gram positif yang tersusun sebagai rantai. Beberapa di antaranya termasuk flora normal pada manusia, sedangkan sebagian yang lain berhubungan dengan penyakit infeksi. Bakteri ini menghasilkan beberapa zat ekstra seluler dan enzim. *Streptococcus pyogenes* merupakan kelompok β -hemoliticus golongan A, yang termasuk kelompok besar patogen pada manusia. Bakteri ini berhubungan dengan invasi lokal atau sistemik dan kelainan yang disebabkan oleh reaksi imunologis pasca infeksi streptococcus (Jawetz *et al.*, 2001).

2.3.2. Morfologi

Streptococcus pyogenes berbentuk bulat atau bulat telur dengan diameter 0,6 sampai 1 μm yang tersusun sebagai rantai. Anggota rantai ini sering memberikan gambaran diplokokus, bahkan kadang-kadang terlihat batang. Panjang rantai sangat bervariasi, tergantung lingkungannya (Joklik *et al.*, 1992; Jawetz *et al.*, 2001).

2.3.3. Sifat Pupukan dan Biokimia

Streptococcus pyogenes tumbuh cepat pada media dalam keadaan aerobik atau mikroaerofilik dan tumbuh baik pada suhu 37⁰C (Joklik *et al.*, 1992). Untuk menyuburkan pertumbuhan bakteri ini perlu ditambahkan darah pada media. Koloni bakteri ini pada media membentuk mukoid dengan diameter 1 – 2 mm (Jawetz *et al.*, 2001). *Streptococcus pyogenes* dapat menghasilkan asam tanpa gas dari glukosa, laktosa, salicin, sukrosa, trehalosa dan beberapa macam manitol. Bakteri ini tidak memfermentasi sorbitol, inulin, arabinosa serta rafinosa, juga tidak membentuk

katalase sehingga dapat dibedakan dengan *Staphylococcus*. Adapun untuk membedakan dengan *Diplococcus* dilakukan uji Optosin (Barrow and Felthan, 1993).

2.3.4. Resistensi

Streptococcus sp. tidak tahan terhadap kekeringan atau cahaya matahari serta mudah dibunuh dengan bahan-bahan kimiawi. Kebanyakan bakteri ini mati pada suhu 60°C selama 50 menit. Sebaliknya, pada bulu dan kulit serta pada benda-benda mati seperti kotoran hewan, *Streptococcus* dapat bertahan sampai tiga minggu (Ratnasari dkk., 1992).

2.3.5. Struktur Antigen, Toksin, dan Enzim

Streptococcus pyogenes mempunyai struktur antigen yang berbentuk karbohidrat-C, protein-M, protein-T dan kapsul. Kekhususan serologis karbohidrat-C ditentukan oleh gula amino. Untuk bakteri ini gula amino tersebut adalah *Rhamnosa n-acetyl glucosamin*. Antigen protein-M dan antigen kapsul merupakan zat yang erat hubungannya dengan virulensi bakteri ini, terutama terdapat pada organisme yang tidak berkilau atau mukoid. Protein -M merupakan faktor virulensi utama pada *S.pyogenes* grup A. Antigen ini menghalangi fagositosis terhadap *Streptococcus* virulen. Sedangkan antigen protein-T tidak mempunyai hubungan dengan virulensi dari bakteri streptokokus (Joklik *et al.*, 1992; Jawetz *et al.*, 2001).

Toksin dan enzim yang dapat dihasilkan oleh *Streptococcus pyogenes* antara lain :

1. Streptokinase, dihasilkan oleh banyak strain *Streptococcus* beta hemolitikus. Zat ini mengubah plasminogen serum manusia menjadi plasmin, yaitu suatu enzim proteolitik aktif yang menghancurkan fibrin dan protein-protein lain. Proses tersebut dapat dihalangi oleh antibodi spesifik yang disebut anti streptokinase.

2. Streptodornase (deoksiribonuklease streptokokus); adalah suatu enzim yang melakukan depolimerisasi DNA. Aktifitas enzimatikanya dapat diukur dengan penurunan viskositas larutan DNA.
3. Hialuronidase; adalah suatu enzim yang memecahkan asam hialuronat, suatu komponen penting bahan dasar jaringan ikat. Sehingga akan membantu penyebaran kuman.
4. Toksin Eritrogenik; toksin menyebabkan ruam pada scarlet fever. Toksin ini mengakibatkan pembentukan antitoksin yang dapat diukur dengan tes Dick yang akan memperlihatkan eritema dan edema jika positif.
5. Difosfopiridin nukleotidase; enzim ini berhubungan dengan kemampuan organisme untuk mematikan leukosit.
6. Hemolisin atau Streptolisin (Streptolisin O dan streptolisin S); mempunyai kemampuan untuk menghemolisis sel-sel darah merah (Jawetz *et al.*, 1996; Sherris *et al.*, 1984).

2.3.6. Patogenitas

Jalan masuknya bakteri menentukan gambaran klinik. Bila tempat masuknya lewat kulit akan timbul erisipelas dengan edema masif. Jika *Streptococcus* masuk ke uterus setelah proses melahirkan, akan timbul demam puerperalis dan septikemia.

Infeksi lokal yang paling sering terjadi adalah pyoderma, mastitis pada sapi dan *infectious dermatitis* pada babi (Sherris *et al.*, 1984; Radostits *et al.*, 2000; Jawetz *et al.*, 2001). Menurut Ratnasari dkk (1992) infeksi neonatal pada anak sapi sering melibatkan spesies *S.pyogenes* sebagai penyebabnya.

Pada manusia, selain infeksi kulit seperti pyoderma, Erysipelas dan cellulitis, juga dapat menyebabkan infeksi pada traktus respiratorius bagian atas seperti infeksi faringeal dan Scarlet Fever, di samping itu streptokokus jenis ini dapat menyebabkan Rheumatic fever dan acute glomerulonephritis (Freeman, 1985).

2.4. *Pasteurella multocida*

2.4.1. Etiologi

Bakteri *Pasteurella* pertama kali ditemukan oleh Pasteur pada tahun 1880 pada ayam yang menderita kolera. Kemudian disusul oleh penemuan-penemuan lainnya, misalnya pada kelinci (1881), pada babi (1886) dan sebagainya (Anonimus, 1980).

Pasteurella multocida terdapat di seluruh dunia, pada saluran pernapasan dan gastrointestinal dari hewan domestik dan liar. Mula-mula diketahui bakteri *Pasteurella* hanya bersifat saprofit pada hewan yang menjadi induk semang. Kemudian diketahui dapat ditularkan dari satu jenis hewan ke hewan lainnya. Hewan-hewan tersebut ada yang menjadi pembawa (carrier) penyakit dan bahkan ada yang menjadi sumber penularan bagi hewan lainnya yang peka (Joklik *et al.*, 1992; Jawetz *et al.*, 2001).

Di negara yang telah melakukan penelitian diketahui bahwa *Pasteurella* dapat menginfeksi babi (48 %), sapi (80 %), tonsil anjing (85 %), rongga hidung anjing (10 %), gusi kucing (90 %) dan tenggorokan manusia (3 %). Selain itu bakteri telah berhasil diisolasi dari kelinci, burung dara, burung pelikan, kuda, kambing, domba, rusa, tikus, kanguru, ayam dan itik. Pada manusia *Pasteurella multocida* merupakan penyebab infeksi sistem pernapasan suppuratif, khususnya pada petani dan orang-

orang yang hidup didaerah pedalaman yang secara tertutup dekat dengan binatang (Anonimus, 1980; Handijatno dan Tyasningsih, 1994; Joklik *et al.*, 1992).

Menurut Davis *et al.* (1990) infeksi pada manusia oleh *P. multocida* digolongkan dalam tiga kelompok umum :

- Infeksi lokal yang ditularkan dari hewan (paling sering kucing) (selulitis, abses, atau osteomielitis)
- Infeksi traktus respiratorius (pneumonia, empyema, abses paru-paru)
- Infeksi sistemik (bakterimia, peritonitis, meningitis)

Berdasarkan kenyataan bahwa bakteri *Pasteurella* menunjukkan bentuk koloni dan sifat-sifat yang bermacam-macam, sehingga beberapa peneliti telah membagi bakteri tersebut ke dalam berbagai kelompok. Yang paling banyak diikuti sampai sekarang adalah pembagian menurut Robert (1947) dan Carter (1955) dalam Holt *et al.* (1994). Yang pertama pembagiannya didasarkan atas *mouse protection test*, dan yang kedua atas sifat-sifat antigen selubung (kapsul bakteri dalam *indirect hemagglutination test*. Roberts membagi bakteri *Pasteurella multocida* menjadi 4 serotipe (tipe I – IV), yang kemudian ditambah lagi oleh Hudson (1954) dengan tipe V. Sedangkan Carter membagi bakteri *Pasteurella multocida* ke dalam 5 serotipe, yaitu : tipe A, B, C, D, dan E. Oleh karena suatu sebab maka tipe C dicabut dari pembagian (Anonimus, 1980; Holt *et al.*, 1994).

2.4.2. Morfologi dan Fisiologi

Bakteri *Pasteurella multocida* adalah organisme yang berbentuk coccobacillus, non motil, kecil dengan ukuran yang sangat halus antara 0,3 – 1,0 μm dan 1,0 – 2,0

μm , bipolar dan gram negatif. Sifat bipolar dan gram negatif ini lebih jelas terlihat dengan pengecatan gram pada bakteri yang baru diisolasi dari penderita, khususnya pada pemisahan jaringan pasien yang terinfeksi (Joklik *et al.*, 1992; Jawetz *et al.*, 2001).

Bakteri yang bersifat gram negatif ini tidak membentuk spora, bersifat non motil, berada dalam bentuk tunggal atau berpasangan, adakalanya dalam rantai pendek. Bentuk koloninya tidak selalu seragam, tergantung pada berbagai faktor antara lain; macam media yang digunakan, umur bakteri dalam perbenihan, frekwensi pemindahan bakteri dan sebagainya (Davis *et al.*, 1990; Joklik *et al.*, 1992)

Pasteurella adalah anaerob fakultatif, katalase dan biasanya oksidase positif. Metabolismenya fermentatif, dan asam diproduksi melalui strain yang memfermentasi glukosa, manitol, dan sukrosa. Khususnya *P. multocida* membebaskan gas yang berbau seperti sperma (Joklik *et al.*, 1992).

2.4.3. Karakteristik Kultur dan Sensitivitas

Pasteurella akan tumbuh pada media laboratorium standar yang mengandung darah atau hematin. Pada agar darah, *P. multocida* tidak hemolitik tapi dapat mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan pada area medium pertumbuhannya. Temperatur untuk pertumbuhan dapat terjadi antara 25°C – 40°C , namun temperatur optimum untuk pertumbuhan *P. multocida* adalah 37°C (Joklik *et al.*, 1992; Jawetz *et al.*, 2001).

Variasi koloni dari *Pasteurella sp.* adalah sama dalam penampilannya, yaitu bulat keabu-abuan, dan ukuran diameternya dari 1-3 mm setelah 24 jam.

Beberapa strain *P.multocida*, ditandai dengan pleomorfisme pada kultur utamanya. Organisme ini virulen karena memproduksi kapsul yang dapat dilihat melalui pengecatan Carbol fuchsin dan dengan pengecatan Giemsa terutama dari eksudat purulen yang lama-kelamaan dapat hilang karena penyimpanan yang lama (Joklik *et al.*, 1992; Baron *et al.*, 1994).

Beberapa strain *P.multocida* khusus yang diisolasi dari sistem pernapasan, memproduksi sejumlah kapsul asam hialuronat yang encer pada mukoid yang merupakan ciri koloninya. Strain virulen lainnya memproduksi koloni berwarna warni yang halus pada subkultur, yang dengan mudah berdisosiasi pada bentuk-bentuk koloni halus tidak berwarna dan biru kasar. Yang terakhir adalah 2 koloni yang berlainan yaitu yang tidak berkapsul dan tidak virulen (Joklik *et al.*, 1992).

Sensitivitas : *P.multocida* akan cepat mati dengan pemanasan pada suhu 55⁰C dan dengan phenol (0,5 %) dalam waktu 15 menit. Akan tetap hidup dan tetap virulen dalam darah kering atau darah murni selama 3 minggu dan dalam kultur atau jaringan selama beberapa bulan jika dimasukkan frozen.

2.4.4. Struktur Antigen

Tipe antigen multiple dari *P.multocida* dapat dibedakan berdasarkan antigen somatik dan antigen kapsuler. Pada dasarnya, antigen kapsuler polisakarida mempunyai 4 serotipe yang berbeda, yang ditandai dengan serotipe A, B, D, dan E. Tipe A dan D merupakan frekuensi paling besar yang dihubungkan dengan infeksi manusia (Joklik *et al.*, 1992).

Sejumlah antigen somatik bakteri ini (grup O) berbeda. Joklik *et al.* (1992) membedakan grup O menjadi 16 kelompok atau serovar. Tipe antigen O ini juga telah

diperlihatkan kombinasinya bersama dengan serotip kapsuler (tipe selubung) yang mana telah mengadakan sistem untuk identifikasi penyakit. Misalnya penyakit Septicemia Epizootica (SE) yang disebabkan oleh *P.multocida* .

Serovar dari strain ini ditandai melalui nomor-nomor yang menunjukkan tipe antigen somatik (grup O), diikuti oleh huruf yang menunjukkan tipe kapsuler. Misalnya bakteri penyebab SE di Asia dengan serovar - : B , sedangkan di Afrika Tengah dengan serovar 6 : E, kolera unggas dengan serovar 5 : A dan 9 : A, shipping fever dengan serovar 1 : A atau D, dan sebagainya (Joklik *et al.*, 1992).

2.4.5. Penentu Patogenesitas

Organisme yang berkapsul biasanya patogen pada tikus, tapi faktor lain yang menentukan penyakit, termasuk antigen somatik yang memainkan peranan penting dalam patogenesitas. Dinding sel *Pasteurella* mempunyai aktifitas endotoksin yang signifikan, tapi telah diketahui tidak ada eksotoksin.

Aktivitas neuraminidase terjadi pada *P.multocida* dan *P.haemolytica*, dan fimbriae yang berfungsi sebagai adhesin pada *P.multocida* tipe A memainkan peranan dalam kolonisasi dan infeksi mukosa nasofaring. Beberapa strain memproduksi hyaluronidase, khususnya isolat-isolat dari binatang yang mengalami Septicemia haemorrhagie. (Joklik *et al.*, 1992 ; Davis *et al.*, 1990).

2.5. Cara Penentuan Aktivitas Antibakteri

Berghe and Vlietinck (1991) dan Paxton (1991) menyatakan bahwa penentuan aktivitas bakteri patogen terhadap antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu dari tiga metode pokok yaitu dilusi, difusi dan bioautografi.

2.5.1. Metode Penyebaran (Diffusion Method)

Metode ini terdiri dari :

1. Metode cakram kertas (Paper Disk Method)
2. Metode cairan dalam cincin (Ring Diffusion Method)
3. Metode lubang (Hole Plate Method)

Metode ini dilakukan dengan menanam bakteri pada lempeng agar yang sesuai, kemudian cakram/silinder yang telah ditetesi dengan bahan uji atau dapat juga bahan uji dimasukkan dalam lubang/cangkir agar, yang telah dibuat pada media. Media yang berisi inokulum bakteri dan bahan uji diinkubasi pada suhu 36-37°C, selama 12-24 jam. Aktivitas anti bakteri dapat dilihat dengan mengukur diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri disekitar cakram, lubang atau cangkir agar. Makin besar daerah hambatan pertumbuhan tersebut berarti aktivitas bahan uji terhadap bakteri makin baik. Keuntungan metode difusi adalah jumlah sampel kecil dan dapat dikerjakan dalam satu petri disk 5-6 sampel sekaligus untuk satu jenis mikroorganisme. Bilamana perlu luas zona hambatan bisa dibandingkan dengan antibiotik tertentu untuk mendapatkan gambaran sampai seberapa potensi antimikroba dari bahan uji, tetapi hal ini tidak dapat memperlihatkan senyawa yang terkandung dalam bahan uji tersebut.

2.5.2. Metode Pengenceran (Dilution Method)

1. Metode pengenceran agar (Agar Dilution Method)

Metode pengenceran untuk penentuan kerentanan organisme terhadap agen antimikroba, dimana sejumlah antibiotik dipersiapkan dalam konsentrasi broth atau agar yang menurun melalui teknik pengenceran serial, kemudian menginokulasi

suspensi bakteri yang diuji. Kerentanan organisme ditentukan setelah inkubasi melalui pengamatan pertumbuhan secara makroskopis. Pertumbuhan tidak teramati pada konsentrasi/kadar obat antibiotik terendah, merupakan pengukuran efek bakteriostatik dan umumnya disebut sebagai kadar hambat minimal (MIC = Minimal Inhibited Concentration). Dengan menggunakan media agar, teknik ini dapat diteruskan dengan penentuan pengaruh bakterisidal dari antibiotik atau kadar bakterisidal minimal (MBC = Minimal Bactericidal Concentration) (Baron *et al.*, 1994).

2. Metode Pengenceran Tabung (Tube Dilution Method)

Cara pengenceran dalam tabung dapat dilakukan dengan mengencerkan bahan uji dalam media cair menjadi kelipatan dua secara bertahap sehingga didapatkan beberapa konsentrasi dengan kelipatan setengahnya, sedangkan pada pengenceran agar menggunakan satu sri lempeng agar dengan konsentrasi bahan uji yang berbeda. Selanjutnya diinokulasi dengan suspensi bakteri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 36-37⁰C, kemudian diamati hambatan pertumbuhan bakteri dengan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhan dengan kontrol media yang mengandung media, konsentrasi penghambatan minimal didapatkan pada tabung yang jernih pada pengenceran tertinggi. Metode ini digunakan untuk mengetahui harga kadar hambat minimal suatu bahan antibakteri.

2.5.3. Metode bioautografi (Bioautografi Method)

Metode ini sangat berguna untuk mengetahui senyawa baru atau senyawa yang belum diketahui aktivitas antibakterinya. Bahan uji dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi agar dan inokulum bakteri melalui proses difusi, yang terdiri dari :

1. Metode bioautografi kontak (contact bioautography)

Metode ini menggunakan prinsip difusi senyawa yang terpisah dengan kromatografi lapis tipis atau kromatografi kertas. Lempeng kromatografi diletakkan pada permukaan agar yang telah diinokulasi bakteri. Setelah kurang lebih 30 menit lempeng dipindahkan, diinkubasi dan diamati senyawa antibakteri yang akan berdifusi pada lapisan agar dan menghambat pertumbuhan bakteri.

2. Metode bioautografi langsung (direct bioautography)

Pada metode ini, dimana zona hambatan diamati secara langsung pada lempeng kromatografi yang telah disemprot suspensi bakteri dalam media cair, kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.

3. Metode bioautografi pencelupan (immersion bioautography)

Dalam metode ini, dimana media yang telah diinokulasi bakteri, setelah media yang menempel pada lempeng kromatografi mengeras, lalu diinkubasi dan dilakukan pengamatan daerah hambatan.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Penyakit zoonosis dan penyakit infeksi merupakan penyakit yang banyak diderita masyarakat Indonesia sejak dulu. Salah satu penyebab penyakit ini adalah bakteri termasuk diantaranya bakteri *Pasteurella multocida* dan *Streptococcus pyogenes*. Bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah bakteri gram positif yang merupakan salah satu penyebab infeksi lokal pada kulit yang dapat menyerang hewan dan manusia. Sedangkan bakteri *Pasteurella multocida* bersifat gram negatif, merupakan penyebab infeksi sistem pernapasan suppuratif, khususnya pada petani dan orang-orang yang hidup di daerah pedalaman yang secara tertutup dekat dengan binatang (Anonimus, 1980; Joklik *et al.*, 1992).

Pada waktu sekarang penyakit diatas dapat ditanggulangi menggunakan obat modern diantaranya antibiotika. Permasalahan dalam terapi antibiotika pada penyakit infeksi adalah beraneka ragamnya etiologi penyakit baik oleh bakteri gram positif maupun negatif, sementara tidak semua antibiotik berspektrum luas, sehingga tidak bisa membunuh semua bakteri tersebut dan sulitnya menentukan jenis antibiotika yang tepat, hal ini disebabkan karena mikroba semakin resisten terhadap antibiotika akibat pemakaiannya yang tidak tepat (Soetanto, dkk., 2001).

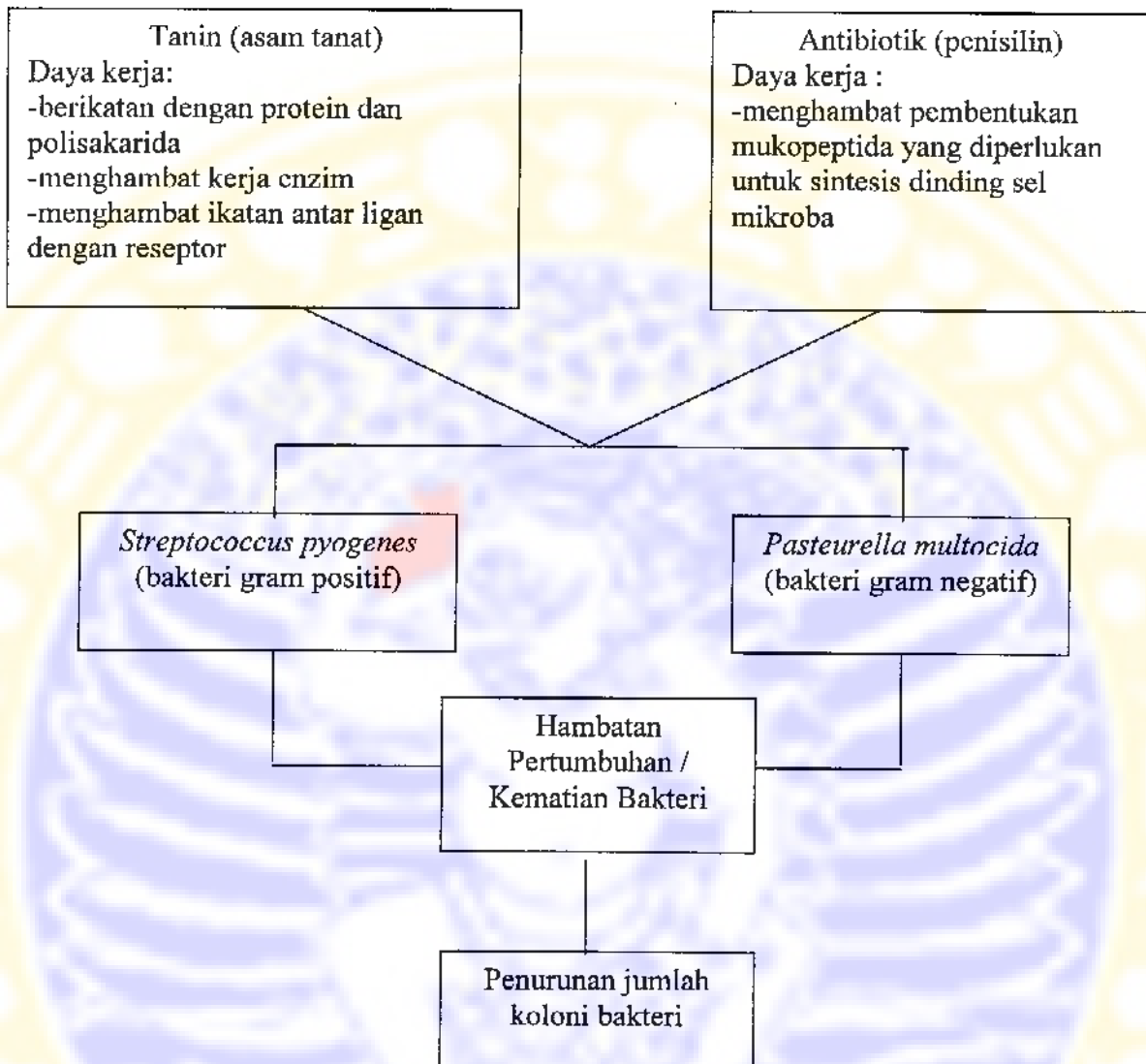
Bentuk zat aktif berbagai obat modern berasal dari alam, seperti atropin, digitalis, antibiotik penisilin merupakan hasil alam, maka dapat direnungkan bahwa

obat dari alam yang digunakan secara tradisional mungkin saja mempunyai dasar kebenaran yang belum banyak diungkapkan.

Tanin yang banyak terdapat dalam tanaman seperti pada daun jambu biji telah diketahui mempunyai khasiat dalam pengobatan antidiare. Sebagai antibakteri, tanin, khususnya dalam pengobatan diare dan disentri juga telah diketahui, tapi penggunaan untuk pengobatan infeksi kulit oleh *S.pyogenes* dan infeksi pernapasan supuratif oleh *P.multocida* belum diketahui termasuk perbedaan daya bunuhnya terhadap bakteri gram positif dan negatif, perlu diteliti apakah tanin tersebut berspektrum luas atau tidak. Maka dicoba pembuktiannya melalui eksperimental khususnya pembuktian daya zat aktif tanin yang berkhasiat sebagai anti bakteri.

Streptococcus pyogenes adalah bakteri yang memiliki kapsul berupa polisakarida dan mempunyai protein-M pada dinding sel sebagai faktor virulensi utama di samping menghasilkan beberapa enzim. Sedangkan *P.multocida* adalah bakteri yang mempunyai kapsul polisakarida dan menghasilkan beberapa enzim.

Sebagai antibakteri diharapkan tanin mempunyai peranan yang terlibat dalam penghambatan terhadap sintesis dinding sel bakteri melalui ikatannya dengan protein maupun polisakarida dan penghambatan terhadap sintesis protein bakteri melalui aktifitas kerjanya dalam menghambat kerja enzim. Dengan demikian tanin diharapkan akan dapat digunakan untuk pengobatan pada infeksi kulit oleh *S.pyogenes* maupun infeksi sistem pernapasan suppuratif karena *P.multocida*, khususnya fungsi daya hambat dan daya bunuhnya terhadap kedua bakteri tersebut jika dibandingkan dengan penisilin.



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual Penelitian

3.2. Hipotesis Penelitian

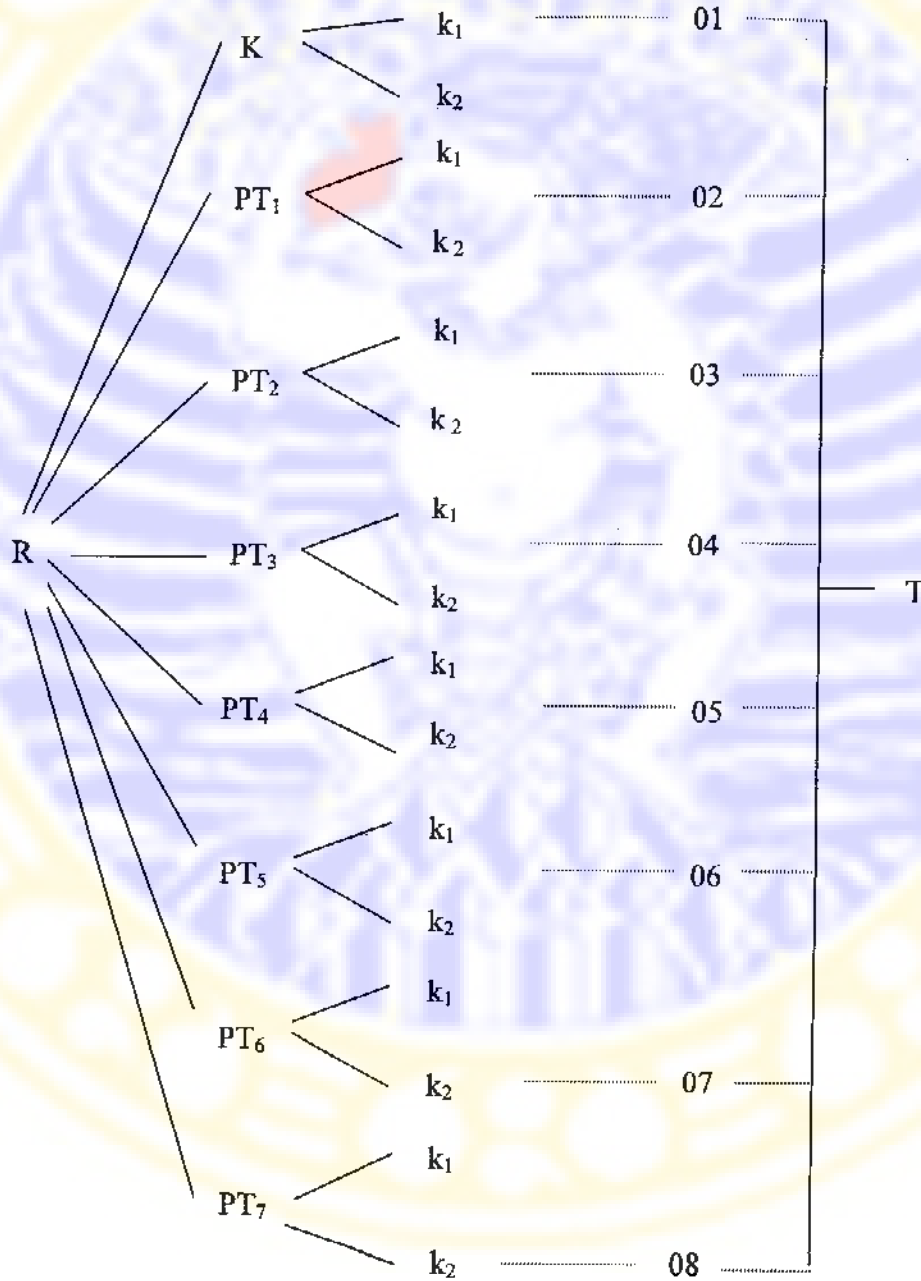
Terdapat perbedaan pengaruh berbagai macam konsentrasi antara tanin dan penisilin terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* secara *in vitro*.

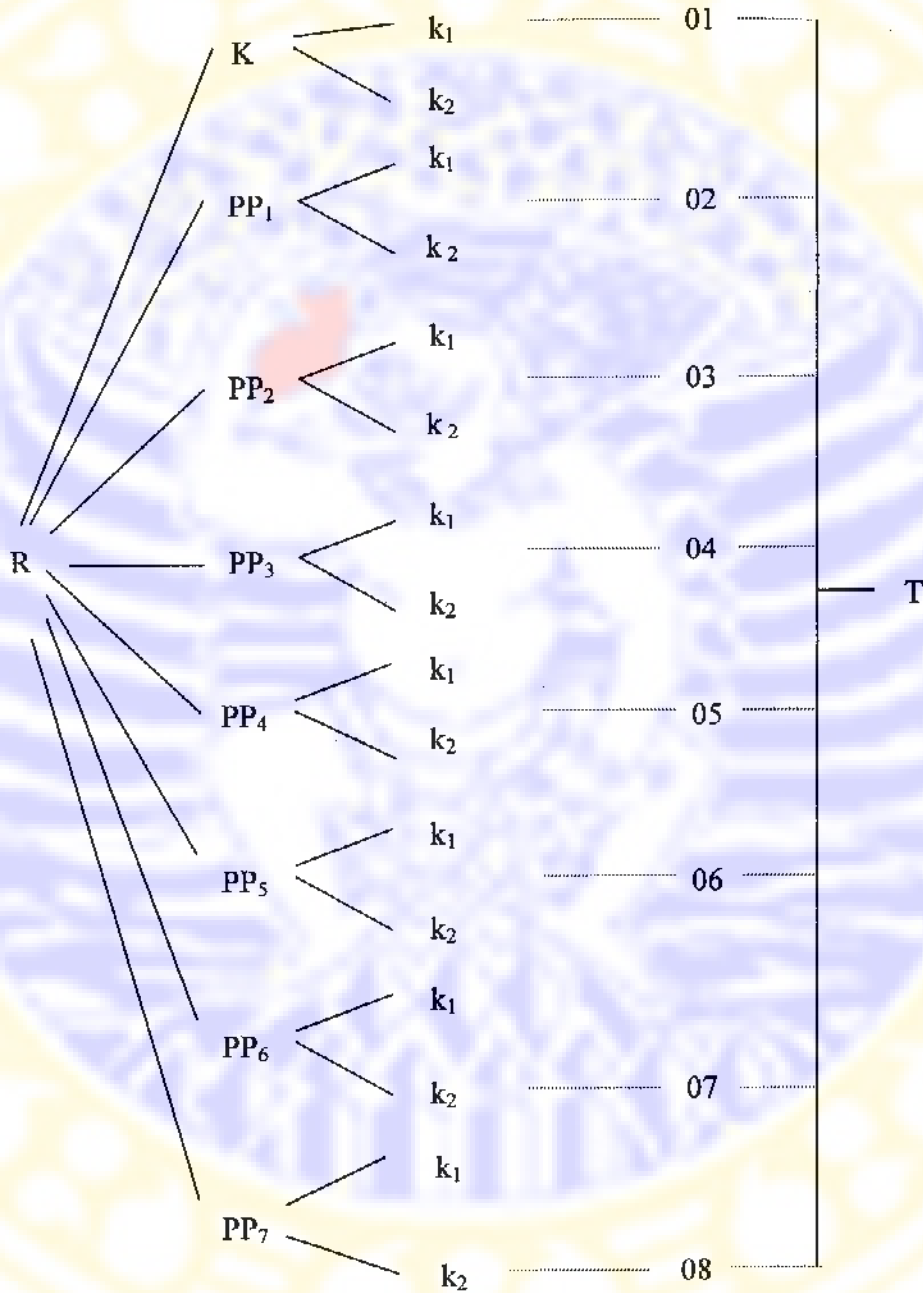
BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan **Penelitian Eksperimental Laboratoris**.

Rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut:





Keterangan :

R : Randomisasi

K : Kontrol, kelompok kontrol adalah pelarut tanpa pemberian tannin maupun penisilin

PT : Perlakuan (PT1,PT2,PT3,PT4,PT5,PT6,PT7) merupakan kelompok perlakuan yang berbeda – beda konsentrasi tanin yang akan diujikan.

PT1 : Perlakuan dengan konsentrasi tanin atau asam tanat 1000 μ g/ml;

PT2 : Perlakuan dengan konsentrasi tanin atau asam tanat 500 μ g/ml;

PT3 : Perlakuan dengan konsentrasi tanin atau asam tanat 250 μ g/ml;

PT4 : Perlakuan dengan konsentrasi tanin atau asam tanat 125 μ g/ml;

PT5 : Perlakuan dengan konsentrasi tanin atau asam tanat 62,5 μ g/ml;

PT6 : Perlakuan dengan konsentrasi tanin atau asam tanat 32 μ g/ml;

PT7 : Perlakuan dengan konsentrasi tanin atau asam tanat 16 μ g/ml;

PP : Perlakuan (PP1,PP2,PP3,PP4,PP5,PP6,PP7) merupakan kelompok perlakuan yang berbeda – beda konsentrasi penisilin yang akan diujikan.

PP1 : Perlakuan dengan konsentrasi penisilin 1000 μ g/ml;

PP2 : Perlakuan dengan konsentrasi penisilin 500 μ g/ml;

PP3 : Perlakuan dengan konsentrasi penisilin 250 μ g/ml;

PP4 : Perlakuan dengan konsentrasi penisilin 125 μ g/ml;

PP5 : Perlakuan dengan konsentrasi penisilin 62,5 μ g/ml;

PP6 : Perlakuan dengan konsentrasi penisilin 32 μ g/ml;

PP7 : Perlakuan dengan konsentrasi penisilin 16 μ g/ml;

(Baron *et al.*, 1994; Mahtuti, 2003; Rohman, 1997).

O : Observasi atau hasil

k1 : bakteri *Streptococcus pyogenes*

k2 : bakteri *Pasteurella multocida*

T : Banyaknya ulangan penelitian menurut Nagar and Das, 1981; yang dilakukan dalam perhitungan jumlah koloni bakteri adalah:

$$r = 1 + \frac{14}{t-1}$$

Keterangan :

r : ulangan

t : perlakuan = 7 perlakuan yaitu konsentrasi 16, 32, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μ g/ml

Perhitungan untuk ulangan adalah sebagai berikut :

$$r = 1 + \frac{14}{t-1}$$

$$r = 1 + \frac{14}{7-1}$$

$$r = 1 + \frac{14}{6} \quad r = 4 \text{ kali ulangan}$$

4.2. Sampel Penelitian

4.2.1. Tanin (asam tanat)

Senyawa tanin (tannic acid powder pure) merupakan sampel dalam penelitian diperoleh dari PT. Merck dengan kode 203 K16599973.

4.2.2. Penisilin

Antibiotik berupa penisilin G (*Benzylpenicillin*) Sigma EC No 200-710-2 diperoleh dari Balivet Bogor.

4.2.3. Bakteri uji

Bakteri uji yang merupakan sampel dalam penelitian ini adalah *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 dan *Pasteurella multocida* ATCC 12947 yang diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Laboratorium Pusvetma Surabaya, diambil dari koloni pada media perbenihan.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Klasifikasi variabel.

a. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi tanin dan penisilin yakni :1000 μ g/ml; 500 μ g/ml; 250 μ g/ml; 125 μ g/ml; 62.5 μ g/ml; 32 μ g/ml; 16 μ g/ml; (Baron *et al.*, 1994).

b. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah pertumbuhan bakteri uji terhadap senyawa tanin dan penisilin.

c. Variabel kendali.

Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi :

- Jenis medium
- Jumlah inokulum
- Temperatur ruangan inkubasi
- Lama waktu inkubasi
- Umur bakteri uji
- Alat-alat yang digunakan

4.3.2. Definisi Operasional variabel

a. Variabel bebas.

Tanin adalah golongan senyawa kompleks yang terdistribusi dalam tumbuhan (Trease and Evans, 1978). Penisilin adalah antibiotika golongan betalaktam yang merupakan asam organik, terdiri dari satu inti siklik dengan satu rantai samping (Ganiswara dkk., 1995). Konsentrasi adalah senyawa tanin dan penisilin yang dilarutkan dalam pelarut dan diencerkan dengan media *BHI Broth* sehingga diperoleh kadar 1000 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62.5 $\mu\text{g/ml}$; 32 $\mu\text{g/ml}$; dan 16 $\mu\text{g/ml}$.

b. Variabel tergantung

Pertumbuhan bakteri uji adalah pertumbuhan bakteri terhadap senyawa tanin dan penisilin yang diketahui secara kuantitatif berdasar jumlah bakteri yang dihitung pada media pertumbuhan setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C.

c. Variabel kendali

- Jenis medium adalah medium yang digunakan untuk uji kepekaan bakteri sekaligus sebagai pengencer dalam membuat setiap konsentrasi sampel tanin yaitu *BHI Broth* dan untuk mengetahui jumlah bakteri yang hidup dilakukan menggunakan *Blood Agar*.
- Jumlah inokulum adalah jumlah bakteri uji yang disuspensikan pada larutan garam NaCl 0.9 % disesuaikan dengan kekeruhan atau endapan BaSO₄ 1 %. Endapan BaSO₄ terbentuk sesuai dengan jumlah bakteri yang telah ditabelkan dan dikenal dengan nama MC Farland Tabel 0,5 dengan jumlah bakteri diperkirakan $1,5 \times 10^8$ /ml (Baron *et al.*, 1994)
- Temperatur ruang inkubasi adalah temperatur pada inkubator yang digunakan untuk mengeramkan bakteri uji yaitu pada suhu 37°C.
- Lama waktu inkubasi adalah lama pengeraman yaitu selama 24 jam.
- Umur bakteri uji adalah bakteri yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat/instrumen penelitian yang telah disterilisasi memakai oven maupun autoclave.

4.4 Bahan Penelitian

Bahan - bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Akuades steril, Tanin (asam tanat), Aceton 2%, 0,05 ml BaCL₂ 1%, 9,95 ml H₂SO₄ 1 %, *Blood Agar*, *BHI Broth*, Alkohol 70 %, Bakteri *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 dan *Pasteurella multocida* ATCC 12947, Antimikroba Penisilin murni, Alkohol 95 %

4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan dalam penelitian adalah

- Cawan Petri, Tabung Reaksi dan Rak, Bunsen, *Erlenmeyer*, *Autoclave*, Inkubator, Timbangan Analitik, Jarum Ose, *Colony counter*, *Magnetic stirer*, Almari es, Semprit injeksi, PH stick, *Spektrophotometer*.

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium PMPP (Peningkatan Mutu dan Pengembangan Produksi) Pusat Veterinary Farma (Pusvetma).

4.6.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2004 sampai Januari 2005.

4.7. Prosedur Kerja.

4.7.1. Tahap Persiapan

1. Membuat biakan bakteri uji.

Untuk membuat biakan bakteri uji maka bakteri uji diperbanyak pada medium *Blood Agar*. Kemudian semuanya dieramkan pada suhu 37°C , selama 24 jam. Biakan *Streptococcus pyogenes* pada *Blood Agar* menunjukkan hemolisis β (jernih) di sekitar koloni. Biakan *Pasteurella multocida* pada *Blood Agar* menunjukkan koloni kecil, translusen, non hemolitik.

2. Membuat suspensi bakteri uji.

Pada setiap biakan bakteri uji diambil 5 koloni, kemudian disuspensikan / dimasukkan dalam masing-masing tabung yang berisi 8 ml larutan natrium klorida (NaCl) 0,9 %. Setelah itu, kekeruhan natrium klorida yang berisi bakteri uji tersebut disesuaikan dengan kekeruhan standar BaSO_4 0,5 (Mc Farland 0,5). Setelah kekeruhannya sesuai, bakteri uji dalam media cair tersebut dapat ditanam pada media test / media pemeriksaan (BHI Broth) yang digunakan untuk penelitian (Baron *et al.*, 1982).

4.7.2 Pembuatan Larutan Standar Mac Farland

Larutan standar Mac Farland 0,5 digunakan sebagai pembanding kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair. Urutan kerja pembuatan Mac Farland pada nomor 0,5 adalah sebagai berikut:

- Membuat larutan barium klorida (BaCl_2) 1 % dalam akuades sebanyak 10 ml.

- Membuat larutan asam belerang (H_2SO_4) 1% dalam akuades sebanyak 10 ml.
- Mencampurkan kedua larutan tersebut dengan perbandingan 0,05 ml $BaCl_2$ (1%) dan 9,95 ml H_2SO_4 (1%), seperti tercantum dalam tabel sebagai berikut:

Tabel 4.1. *Mc Farland Nephelometer Standar*

Tabung	Asam Sulfat 1 %	Barium Chlorida 1 %	Perkiraan Jumlah bakteri
0,5	9,95 ml	0,05 ml	150 juta/ml
1	9,9 ml	0,1 ml	300 juta/ml
2	9,8 ml	0,2 ml	600 juta/ml
3	9,7 ml	0,3 ml	900 juta/ml
4	9,6 ml	0,4 ml	1200 juta/ml
5	9,5 ml	0,5 ml	1500 juta/ml
6	9,4 ml	0,6 ml	1800 juta/ml
7	9,3 ml	0,7 ml	2100 juta/ml
8	9,2 ml	0,8 ml	2400 juta/ml
9	9,1 ml	0,9 ml	2700 juta/ml
10	9,0 ml	1,0 ml	3000 juta/ml

Sumber: Baron *et al.*, 1994.

- Menyimpan pada suhu kamar ditempat gelap serta tidak terkena sinar matahari.
- Simpan dalam suhu ruang dapat digunakan untuk enam bulan (WHO, 1991).
- Untuk metode klasik *broth dilution test*, standar inokulum mikroorganisme adalah 1×10^6 *colony forming units* (CFU)/ml (Baron *et al.*, 1982).

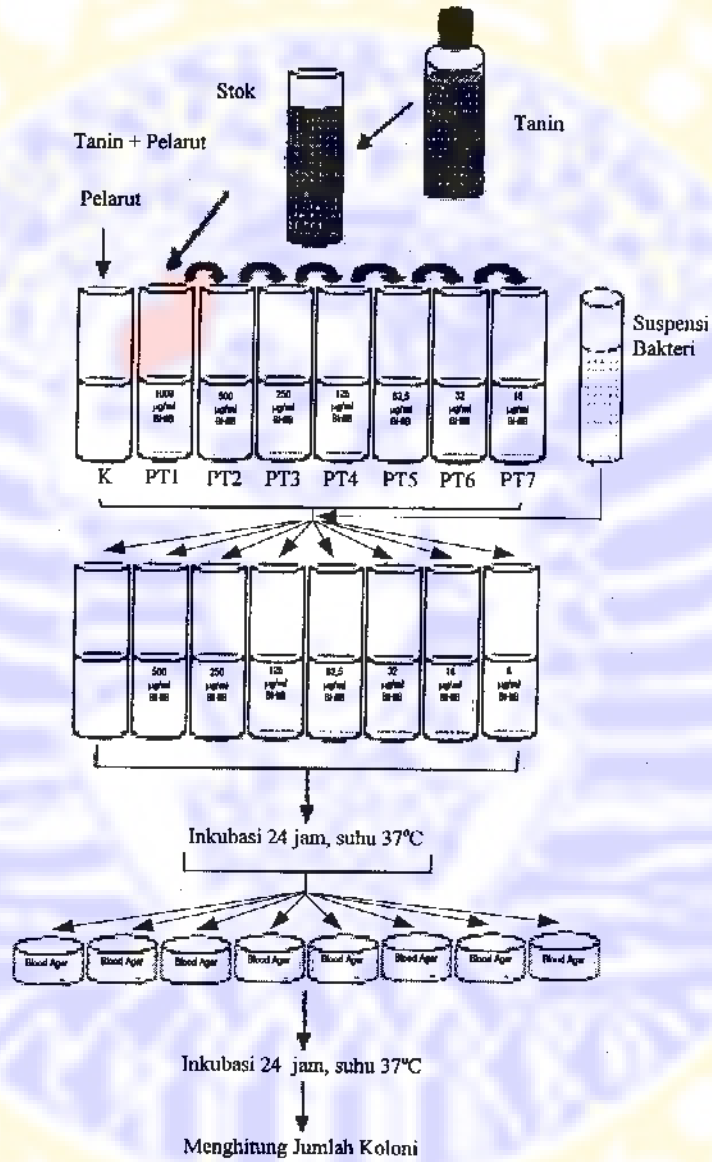
4.7.3 Pengujian Senyawa Aktif (Asam Tanin) dengan Metode Dilusi

- Untuk membantu dispersi senyawa aktif yang kurang polar dalam media berair dapat digunakan tween 20 dengan rasio antara zat uji dengan tween 1:8 (sudah merupakan ketetapan), kemudian disuspensikan ke dalam media. Dapat juga dilakukan dengan melarutkan senyawa aktif dalam media. Dapat juga dilakukan

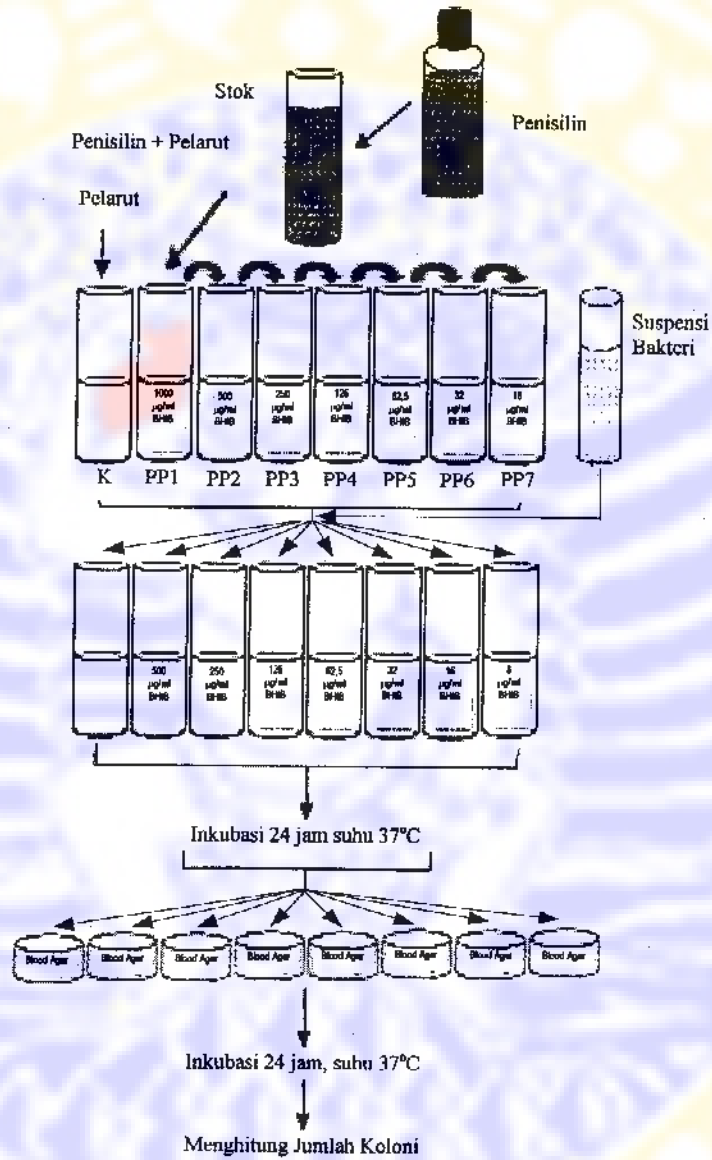
dengan melarutkan senyawa aktif dalam metanol sehingga konsentrasi akhir pelarut ini dalam media uji tidak lebih dari 2 % (Rios, et al., 1988). Menurut Reynold and Martindale, (1996) senyawa aktif tanin larut dalam aseton, larut perlahan – lahan dalam gliserin dan hampir tidak larut dalam karbon disulfid, kloroform, minyak dan parafin. Dalam penelitian ini pelarut yang digunakan adalah aseton 2%.

- Preparasi senyawa aktif yang akan diuji dapat dilakukan sebagai berikut : menimbang senyawa aktif sesuai kebutuhan (100 mg tanin), kemudian melarutkannya dengan pelarut aseton sebanyak 1 ml kemudian ditambah akuades sampai 50 ml, sehingga dihasilkan konsentrasi 2000 $\mu\text{g/ml}$ (dibuat larutan stok dan pH diukur).
- Kemudian diencerkan dengan media BHI Broth, sehingga diperoleh sederetan konsentrasi sampel, yaitu 1000 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$; 32 $\mu\text{g/ml}$ dan 16 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi akhir setelah ditambah suspensi bakteri sama banyaknya, menjadi setengahnya yaitu 500 $\mu\text{g/ml}$; 250 $\mu\text{g/ml}$; 125 $\mu\text{g/ml}$; 62,5 $\mu\text{g/ml}$; 32 $\mu\text{g/ml}$; 16 $\mu\text{g/ml}$ dan 8 $\mu\text{g/ml}$.
- Tiap-tiap konsentrasi ditambah masing-masing 1 ml suspensi bakteri uji yang telah disesuaikan kekeruhannya dengan Mc Farland 0,5 sehingga masing-masing konsentrasi mengandung $7,5 \times 10^7$ CFU/ml.
- Kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Secara visual kepadatan bakteri dicatat.

- Setelah itu dilihat kekeruhan atau turbiditasnya untuk menentukan MIC, bila pada tabung setelah diinkubasi menunjukkan kekeruhan menunjukkan bahwa antimikroba tersebut tidak mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Sebaliknya bila terdapat tidak adanya kekeruhan menunjukkan bahwa mikroorganisme peka terhadap konsentrasi antimikroba dalam tabung tersebut (WHO, 1991; Bibiana dan Hastowo, 1994).
- Setelah dilihat kekeruhannya kemudian diambil atau disubkultur 0,1 ml dari masing – masing konsentrasi dan disebarakan ke dalam media *Blood Agar* yang sudah dipersiapkan dengan metode drop, didiamkan hingga kering pada suhu kamar, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Kemudian dilakukan penghitungan terhadap koloni bakteri, dihitung CFU pada subkultur (jumlah koloni yang muncul) pada semua konsentrasi, kemudian dibandingkan dengan kontrol. (Fardias, 1989; Sahm and Washington, 1991).
- Pada kontrol dilakukan metode yang sama tetapi tanpa diberi anti bakteri (tanin dan penisilin).
- Perlakuan diatas dilakukan pengulangan sebanyak empat kali.
- Dengan metode yang sama untuk menguji aktivitas tanin seperti di atas, dilakukan juga untuk bahan penisilin. Kemudian hasil keduanya dibandingkan dan dianalisis dengan statistik.



Gambar 4.1 Prosedur *Tube Dilution Method* dengan Bahan Tanin



Gambar 4.2 Prosedur Tube Dilution Method dengan Bahan Penisilin

4.8. Analisis Data.

Dari data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan analisis varians (sidik ragam) dua jalur (*Two-way Anova*) dengan tingkat kepercayaan 5 % ($\alpha = 0.05$). Jika diperoleh hasil mempunyai efek yang bermakna (signifikan) antar perlakuan ($F_H > F_T$) berarti H_A diterima, selanjutnya akan dilakukan uji lanjut dengan menggunakan LSD untuk mengetahui perlakuan mana yang aktivitas antibakterinya bermakna atau lebih kuat. Data yang diperoleh antara sebelum perlakuan (kontrol negatif) dan sesudah perlakuan dianalisis dengan menggunakan uji t.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka diperoleh empat macam data, yakni jumlah koloni *Streptococcus pyogenes* dengan pemberian tanin dan penisilin sebagai pembanding serta jumlah koloni *Pasteurella multocida* dengan pemberian tanin dan penisilin sebagai pembanding, masing-masing dalam berbagai konsentrasi. Adapun hasil penelitian yang sudah didapat adalah seperti dalam tabel 5.1.

Selain didapatkan data tersebut, juga dilakukan penghitungan terhadap jumlah awal atau jumlah sebelum diberikan perlakuan terhadap suspensi/biakan bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* secara *in vitro*, yang dilakukan sebanyak 4 kali ulangan, serta dilakukan pengukuran pH. Berdasarkan pelaksanaan penelitian maka didapatkan bahwa pada masing-masing konsentrasi tidak mengalami perubahan pH, yakni didapatkan pH=7 sehingga tidak mempengaruhi keberadaan bakteri atau tidak bersifat menghambat ataupun membunuh bakteri.

Masing-masing ulangan tersebut dilakukan perlakuan sebagai kontrol negatif, untuk perlakuan tanin dan perlakuan penisilin, sehingga diperoleh data yang dapat dilihat pada tabel 5.2. Berdasarkan data yang sudah diperoleh, maka kemudian dilakukan penghitungan jumlah bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* secara *in vitro*, antara sebelum perlakuan dan sesudah diberikan perlakuan

untuk mengetahui penurunan jumlah bakteri pada masing-masing perlakuan, seperti pada tabel 5.4.

Tabel 5.1 Data Jumlah Koloni *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* Berbagai Konsentrasi Tanin dan Penisilin ($\mu\text{g/ml}$)

No	Tanin ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> (CFU/ml)	Jumlah koloni <i>Pasteurella multocida</i> (CFU/ml)	Penisilin ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> (CFU/ml)	Jumlah koloni <i>Pasteurella multocida</i> (CFU/ml)
1.	PT1 I	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP1 I	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
2.	PT2 I	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP2 I	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
3.	PT3 I	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP3 I	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
4.	PT4 I	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP4 I	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
5.	PT5 I	$7,1 \times 10^3$	$3,6 \times 10^4$	PP5 I	$0,0 \times 10^1$	$4,3 \times 10^3$
6.	PT6 I	$1,4 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$	PP6 I	$3,9 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$
7.	PT7 I	$2,1 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5$	PP7 I	$1,1 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
8.	PT1 II	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP1 II	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
9.	PT2 II	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP2 II	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
10.	PT3 II	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP3 II	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
11.	PT4 II	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP4 II	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
12.	PT5 II	$5,6 \times 10^3$	$4,5 \times 10^4$	PP5 II	$0,0 \times 10^1$	$3,1 \times 10^3$
13.	PT6 II	$1,2 \times 10^4$	$9,9 \times 10^4$	PP6 II	$4,4 \times 10^2$	$8,7 \times 10^3$
14.	PT7 II	$2,5 \times 10^4$	$2,2 \times 10^5$	PP7 II	$9,6 \times 10^2$	$2,1 \times 10^4$
15.	PT1 III	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP1 III	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
16.	PT2 III	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP2 III	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
17.	PT3 III	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP3 III	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
18.	PT4 III	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP4 III	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
19.	PT5 III	$8,1 \times 10^3$	$5,8 \times 10^4$	PP5 III	$0,0 \times 10^1$	$6,9 \times 10^3$
20.	PT6 III	$1,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	PP6 III	$3,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4$
21.	PT7 III	$2,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$	PP7 III	$8,2 \times 10^2$	$2,3 \times 10^4$
22.	PT1 IV	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP1 IV	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
23.	PT2 IV	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP2 IV	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
24.	PT3 IV	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP3 IV	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
25.	PT4 IV	$0,0 \times 10^2$	$0,0 \times 10^3$	PP4 IV	$0,0 \times 10^1$	$0,0 \times 10^2$
26.	PT5 IV	$4,4 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$	PP5 IV	$0,0 \times 10^1$	$5,2 \times 10^3$
27.	PT6 IV	$1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	PP6 IV	$5,9 \times 10^2$	$9,8 \times 10^3$
28.	PT7 IV	$2,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	PP7 IV	$1,1 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$

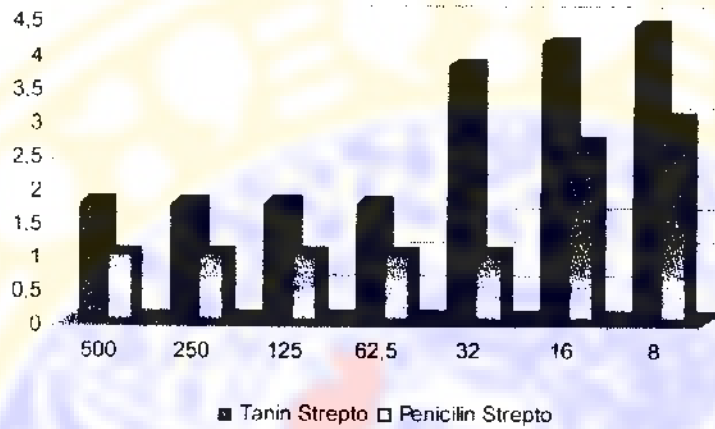
Keterangan :

- PT1 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 500 µg/ml
 PT2 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 250 µg/ml
 PT3 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 125 µg/ml
 PT4 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 62,5 µg/ml
 PT5 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 32 µg/ml
 PT6 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 16 µg/ml
 PT7 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 8 µg/ml
 PP1 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 500 µg/ml
 PP2 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 250 µg/ml
 PP3 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 125 µg/ml
 PP4 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 62,5 µg/ml
 PP5 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 32 µg/ml
 PP6 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 16 µg/ml
 PP7 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 8 µg/ml
 I, II, III, IV : ulangan I, II, III dan IV

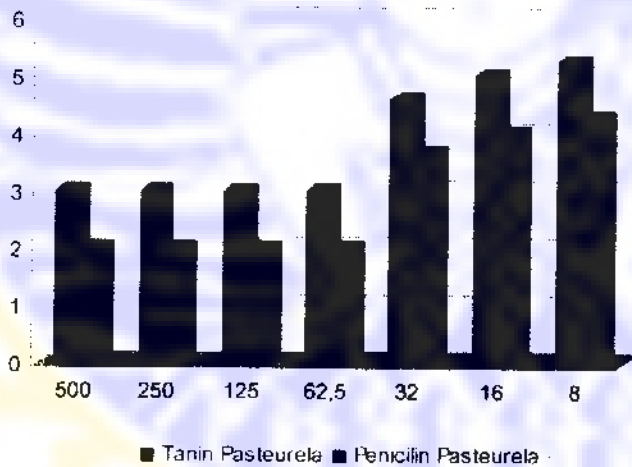
Tabel 5.2 Data Jumlah Koloni *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* Sebelum Pemberian Tanin dan Penisilin (µg/ml) Sebagai Kontrol Negatif

Ulangan	Kontrol Tanin		Kontrol Penisilin	
	<i>Streptococcus pyogenes</i> (CFU/ml)	<i>Pasteurella multocida</i> (CFU/ml)	<i>Streptococcus pyogenes</i> (CFU/ml)	<i>Pasteurella multocida</i> (CFU/ml)
1.	2,4x10 ⁷	2,1 x10 ⁷	2,2 x10 ⁷	2,1 x10 ⁷
2.	2,4x10 ⁷	2,1 x10 ⁷	2,5 x10 ⁷	2,2 x10 ⁷
3.	2,3x10 ⁷	2,0 x10 ⁷	2,3 x10 ⁷	2,0 x10 ⁷
4.	2,2x10 ⁷	2,2 x10 ⁷	2,0 x10 ⁷	2,0 x10 ⁷
Rata2	2,3 x10 ⁷	2,1 x10 ⁷	2,3 x10 ⁷	2,1 x 10 ⁷

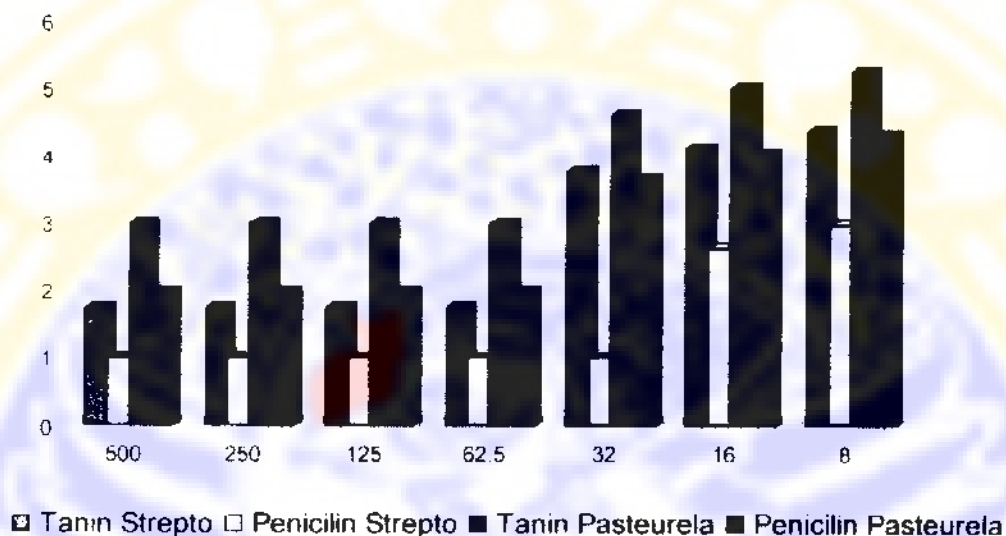
Grafik 5.1 Perbandingan Jumlah Koloni *Streptococcus pyogenes* Setelah Perlakuan dengan Tanin dan Penisilin.



Grafik 5.2 Perbandingan Jumlah Koloni *Pasteurella multocida* Setelah Perlakuan dengan Tanin dan Penisilin.



Grafik 5.3 Perbandingan Jumlah Koloni *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* Setelah Perlakuan dengan Tanin dan Penisilin.



5.2 Analisis Statistik

Tabel 5.3 Hasil Uji Sidik Ragam Rancangan Faktorial dengan $\alpha=0,05$

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	1031.022 ^a	28	36.822	941.047	.000
BAKTERI	41.169	1	41.169	1052.136	.000
BAHAN	34.472	1	34.472	880.983	.000
DOSIS	104.572	6	17.429	445.415	.000
BAKTERI * BAHAN	.453	1	.453	11.565	.001
BAKTERI * DOSIS	1.328	6	.221	5.655	.000
BAHAN * DOSIS	3.232	6	.539	13.767	.000
BAKTERI * BAHAN * DOSIS	3.653	6	.609	15.559	.000
Error	3.287	84	3.913E-02		
Total	1034.309	112			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)
Dependent Variable: Jumlah Koloni

Tabel 5.4 Hasil Uji Statistik (t- test) Jumlah Koloni Sebelum (kontrol) dan Sesudah Perlakuan

	t	df	Sig.(2-tailed)
Pair 1. Kontrol Tanin <i>S.pyogenes</i> – Tanin <i>S.pyogenes</i>	64.657	3	.000
Pair 2. Kontrol Tanin <i>P.multocida</i> – Tanin <i>P.multocida</i>	62.283	3	.000
Pair 3. Kontrol Penisilin <i>S.pyogenes</i> – Penisilin <i>S.pyogenes</i>	21.743	3	.000
Pair 4. Kontrol Penisilin <i>P.multocida</i> – Penisilin <i>P.multocida</i>	87.759	3	.000

Berdasarkan hasil analisis statistik, pada tabel 5.3 dan lampiran serta hasil uji LSD (Lampiran 2) maka didapat hasil bahwa:

1. Diantara kedua bakteri uji (*Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida*) menunjukkan perbedaan yang bermakna, dimana F hitung $>$ F tabel 5% (Sig = ,000), sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Dari hasil analisis statistik didapat juga bahwa kedua bahan uji baik tanin atau penisilin memberikan pengaruh yang lebih baik dalam membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes* jika dibanding terhadap bakteri *Pasteurella multocida*, yang bisa dilihat dari mean keduanya, dimana mean terendah adalah pada bakteri *Streptococcus pyogenes*.
2. Diantara kedua bahan uji (tanin dan penisilin) menunjukkan perbedaan yang bermakna, dimana F hitung $>$ F tabel 5% (Sig = ,000), sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Jumlah bakteri pada perlakuan penisilin menunjukkan mean terendah dibanding perlakuan tanin, maka hal ini menunjukkan bahwa penisilin berdasarkan

uji statistik lebih baik bila dibandingkan dengan tanin dalam membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes* maupun *Pasteurella multocida* secara *in vitro*.

3. Diantara berbagai dosis konsentrasi menunjukkan perbedaan yang bermakna, dimana $F_{hitung} > F_{tabel 5\%}$ ($Sig = ,000$), sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Perlakuan dengan tanin pada kedua bakteri uji dan penisilin pada bakteri *Pasteurella multocida* dengan dosis terendah yang masih dapat membunuh bakteri yaitu $62,5 \mu\text{g/ml}$, yang tidak bermakna terhadap dosis $500 \mu\text{g/ml}$; $250 \mu\text{g/ml}$; $125 \mu\text{g/ml}$, dan bermakna terhadap dosis $32 \mu\text{g/ml}$; $16 \mu\text{g/ml}$; $8 \mu\text{g/ml}$, sedangkan perlakuan dengan penisilin pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan dosis terendah yang masih dapat membunuh bakteri yaitu $32 \mu\text{g/ml}$, yang tidak bermakna terhadap dosis $500 \mu\text{g/ml}$; $250 \mu\text{g/ml}$; $125 \mu\text{g/ml}$; $62,5 \mu\text{g/ml}$, dan bermakna terhadap dosis $16 \mu\text{g/ml}$; $8 \mu\text{g/ml}$.
4. Diantara kedua bakteri uji dengan kedua bahan uji; diantara kedua bakteri uji dengan berbagai dosis konsentrasi; diantara kedua bahan uji dengan berbagai dosis konsentrasi; serta diantara kedua bakteri uji dengan kedua bahan uji dan berbagai dosis konsentrasi terdapat interaksi yang bermakna. Hal ini menunjukkan ada keterkaitan antara bakteri dengan bahan yang digunakan; antara bakteri dan berbagai dosis; antara bahan dan dosis; antara bakteri, bahan dan dosis dalam menghambat dan membunuh bakteri.
5. Berdasarkan F_{hitung} menunjukkan bahwa perbedaan berdasarkan jenis bakteri lebih bermakna dalam mempengaruhi jumlah koloni dibandingkan dengan pengaruh perbedaan bahan dan berbagai dosis, sedangkan perbedaan berdasarkan

bahan lebih bermakna dalam mempengaruhi jumlah koloni dibandingkan dengan pengaruh berbagai dosis. Interaksi antara bakteri, bahan dan dosis lebih bermakna dalam mempengaruhi jumlah koloni dibandingkan dengan pengaruh interaksi antara bahan dan dosis, bakteri dan bahan, bakteri dan dosis.

6. Berdasarkan pengamatan kekeruhan dapat diketahui bahwa MIC (*Minimal Inhibition Concentration*) pada tanin terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* adalah $62,5 \mu\text{g/ml}$ dan penisilin terhadap bakteri *Pasteurella multocida* adalah $62,5 \mu\text{g/ml}$, sedangkan MIC penisilin terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah $32 \mu\text{g/ml}$.
7. Berdasarkan uji t terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* secara *in vitro*, antara sebelum perlakuan (kontrol) dan sesudah diberikan perlakuan pada kedua bahan uji terdapat penurunan yang bermakna (Lampiran 2).

BAB 6

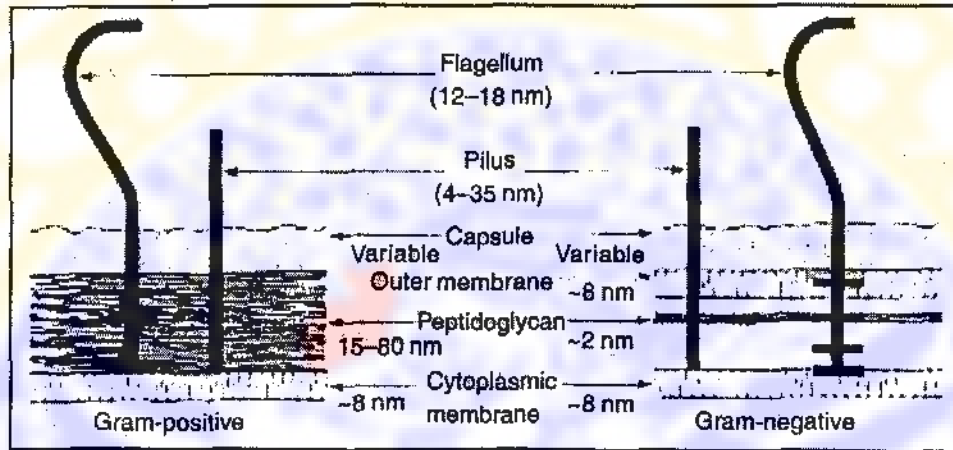
PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis statistik, pada tabel 5.3 dan lampiran serta hasil uji LSD, maka didapat hasil bahwa diantara kedua bakteri uji (*Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida*) menunjukkan perbedaan yang bermakna, dimana F hitung > F tabel 5% (Sig = ,000), sehingga Ho ditolak dan H1 diterima. Dari hasil analisis statistik didapat juga bahwa kedua bahan uji baik tanin atau penisilin memberikan pengaruh yang lebih baik dalam membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes* jika dibanding terhadap bakteri *Pasteurella multocida*, yang bisa dilihat dari mean keduanya, dimana mean terendah adalah pada bakteri *Streptococcus pyogenes*.

Perbedaan aktivitas ini dapat disebabkan perbedaan jenis bakteri uji. *Streptococcus pyogenes* termasuk bakteri Gram positif, sedangkan *Pasteurella multocida* termasuk bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif dan Gram negatif berbeda pada struktur dan komposisi dinding selnya. Komposisi dinding sel bakteri Gram positif mengandung peptidoglikan yang lebih tebal ukurannya (50 – 100 lapisan) sehingga jika dirusak oleh senyawa yang bekerja pada dinding sel akan menyebabkan sel cepat mengalami kematian, sedangkan pada bakteri Gram negatif kandungan peptidoglikannya jauh lebih tipis (1 – 2 lapisan) sehingga sifat kerusakannya lebih kecil (Soekardjo dkk., 2000).

Peptidoglikan merupakan makromolekul penting untuk kehidupan bakteri yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Peptidoglikan

mempunyai peranan penting dalam memelihara keutuhan dinding sel dan bentuk sel karena mempunyai kisi-kisi struktur melintang dan berhubungan sangat erat.



Gambar 6.1. Perbandingan Struktur Selubung Sel Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif (Jawetz *et al.*, 2001)

Dinding sel bakteri adalah struktur yang kompleks dan berfungsi terutama sebagai selubung untuk melindungi protoplasma dan memberikan bentuk karakteristik bakteri. Komposisi struktur polimer dinding sel bakteri Gram-positif berbeda dengan bakteri Gram-negatif.

Tabel 6.1 Struktur polimer dinding sel bakteri

Polimer	Gram – positif	Gram-negatif
Peptidoglikan ^a	50-100 lapis	1-2 lapis
Asam teikoat ^a	+	-
Asam teikuronat ^a	+	-
Lipopolisakarida ^a	-	+
Lipoprotein	-	+
Fosfolipid	-	+
Protein	+/-	+
Polisakarida	+/-	-

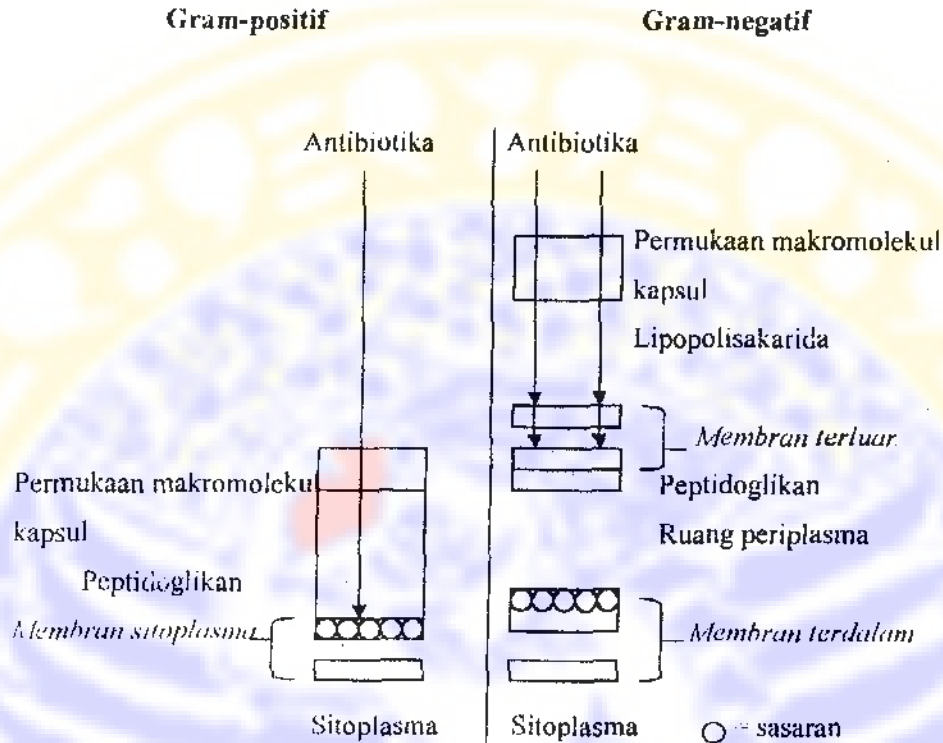
Keterangan :

^a : makromolekul yang hanya didapatkan pada prokariotik

(Soekardjo dkk., 2000)

Penghambatan biosintesis peptidoglikan menyebabkan hilangnya kekuatan dan kekakuan dinding sel sehingga sel mengalami kematian. Kekuatan dan kekakuan peptidoglikan disebabkan oleh rangka dasar struktur, ditulangpunggungi oleh rantai oligosakarida yang dihubungkan bersama-sama melalui rantai cabang peptida pendek. Rantai glikan mengandung residu yang dapat digantikan yaitu N-asetilglukosamin dan asam N-asetilmuramat. Residu muramil diganti dengan rantai peptida yang mengandung residu pengganti, yaitu L dan D asam-asam amino. Rangkaian asam amino dari salah satu peptida adalah L-alanil-D-asam glutamat-L-alanin-D-alanin (Soekardjo dkk., 2000).

Dinding sel bakteri Gram-positif berbeda dengan bakteri Gram-negatif dan hal ini dapat menjelaskan mengapa banyak turunan β -Laktam yang tidak aktif terhadap bakteri Gram-negatif. Perbedaan komposisi dinding sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif dapat dilihat pada Gambar 6.3.



Gambar 6.2 Dinding sel bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Membran terluar bakteri Gram-negatif dapat menghalangi penembusan antibiotika β -Laktam pada sasaran, sedang pada bakteri Gram-positif tidak ada (Soekardjo dkk., 2000)

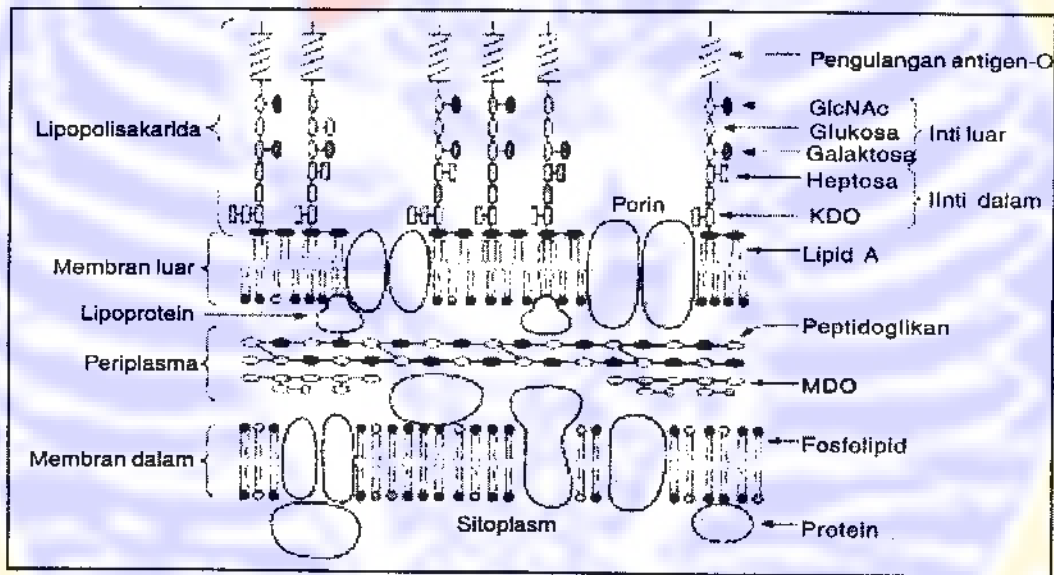
Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa *Minimum Bactericidal Concentration (MBC)* pada tanin terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* maupun *Pasteurella multocida* adalah $62,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ dan penisilin terhadap bakteri *Pasteurella multocida* $62,5 \mu\text{g} / \text{ml}$, sedangkan MBC penisilin terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* adalah $32 \mu\text{g} / \text{ml}$ karena pada konsentrasi tersebut jumlah koloni bakteri nol. Hal ini sudah sesuai dengan teori yang ada yakni bila terjadi penurunan 99,9%

jumlah koloni bakteri dari inokulum maka dikatakan bersifat bakterisidal (Bailey & Scott's, 1994). Maka hal ini menunjukkan bahwa tanin dapat membunuh bakteri *Streptococcus pyogenes* maupun *Pasteurella multocida* secara *in vitro*.

Salah satu zat aktif dari tanaman yang telah diisolasi khususnya tanin dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* maupun *Pasteurella multocida* secara *in vitro*. Hal ini karena tanin mampu melakukan penghambatan terhadap pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* maupun *Pasteurella multocida* yang disebabkan oleh efek fisiologis dan efek farmakologis. Efek fisiologis tanin yaitu mempunyai kemampuan membentuk kompleks dengan protein maupun polisakarida. Pembentukan kompleks ini berdasarkan pada pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik antara tanin dengan protein (Haslam, *et al.*, 1989); serta kemampuan tanin menghambat kerja enzim tertentu secara selektif, seperti enzim "revers virus" transcriptase (Cannell, 1998). Menurut Reynold and Martindale, 1996; tanin dapat berkombinasi dengan protein yang mengakibatkan tanin tahan terhadap enzim pemecah protein, sedangkan menurut Claus, 1974; tanin dapat bersifat menghambat pertumbuhan organisme (bakteriostatik) dan mampu mematikan mikroorganisme (bakterisidal).

Menurut Haslam *et. al.*, (1989) dan Min Zhu *et. al.*, (1997) efek farmakologis tanin yang merupakan golongan polifenol sejak lama diketahui antara lain adalah aktifitas terhadap sistem peredaran darah (tekanan darah tinggi dan efek kapiler), antiviral, antiseptik, inhibisi mutagen, antioksidan dan aktifitas pada sistem pencernaan.

Struktur dinding sel bakteri Gram negatif adalah terdiri dari LPS (lipopolisakarida) yang mengandung fosfolipid, lipid, polisakarida dan protein. Bila senyawa aktif dari tanin yang mengandung gugus hidroksil ini mampu menembus masuk ke dalam dinding sel bakteri maka akan merusak struktur dari dalam peptidoglikan yang berisi N-asetil glukosamin dan N-asetil muramat, serta kedua asam amino yang dihubungkan oleh gelang peptidoglikan hingga membentuk rantai tetrapeptida yang terikat pada muramat.



Gambar 6.3 Gambar Molekular dari Selubung Bakteri Gram Negatif (Jawetz *et al.*, 2001)

Kekuatan ikatan antar asam amino, dibentuk oleh ikatan antara N-asetil glukosamin dan N-asetil muramat, bila tanpa adanya gelang peptidoglikan tidak dapat bergabung atau bergandengan. Antar rantai tetrapeptida dihubungkan oleh ikatan peptida pendek asam amino, yang pembentuknya dibantu oleh enzim *transpeptidase*.

Ikatan antara N-asetil glukosamin dan N-asetil muramat inilah yang akan membentuk suatu ikatan yang kuat pada dinding sel. Tetapi bila ternyata enzim *transpeptidase* ini justru berikatan dengan hidroksil tanin maka menyebabkan bersifat asam dan reaktif terhadap asam amino penyusun peptidoglikan, yakni berupa pengendapan asam amino akibatnya enzim *transpeptidase* tidak berfungsi, sehingga ikatan pembentukan jembatan yang menghubungkan N-asetil glukosamin dan N-asetil muramat tidak terbentuk. Selain daripada itu struktur dinding sel bakteri menjadi lemah, dan dapat mematikan sel. Membran sitoplasmayapun akan rusak sehingga mempermudah komponen intrasel keluar dan komponen luar masuk ke dalam sitoplasma (Volk and Wheeler, 1988; Bibiana dan Hastowo, 1992).

Senyawa aktif pada tanin merupakan senyawa ester galoil yang mengandung gugus HHDP (heksahidroksidifenoil) dan gugus DHHDP (dehidroheksahidroksidifenoil) (Rohman, 1997). Gugus hidroksilnya, baik sebagian atau semuanya, membentuk ikatan ester dengan heksahidroksidifenat (Trease and Evans, 1978). Maka kemungkinan yang terjadi adalah terdapat adanya suatu ikatan antara gugus aktif tanin yakni ester galoil dengan enzim *transpeptidase*, sehingga efektifitas kerja enzim menjadi terganggu yang berakibat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* maupun *Pasteurella multocida* secara *in vitro* bahkan mungkin hingga menimbulkan kematian.

Dengan demikian tanin berdasarkan pada penelitian ini dapat digunakan sebagai antimikroba alternatif selain penisilin. Bila ditinjau efektifitasnya maka tanin ini tidak saja dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* maupun

Pasteurella multocida secara *in vitro*, tetapi juga mempunyai kemampuan untuk membunuh atau bersifat bakterisidal.

Diantara kedua bahan uji (tanin dan penisilin) menunjukkan perbedaan yang bermakna, dimana F hitung $>$ F tabel 5% ($Sig = ,000$), sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Disini menunjukkan bahwa yang mempunyai mean terendah adalah perlakuan penisilin, maka hal ini menunjukkan bahwa penisilin berdasarkan uji statistik lebih baik bila dibandingkan dengan tanin dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* maupun *Pasteurella multocida* secara *in vitro*.

Perbedaan aktivitas antara kedua bahan uji kemungkinan disebabkan pada tanin pembentukan kompleks dengan protein dan polisakarida berdasarkan pada pembentukan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik, sedangkan pada penisilin melalui ikatan kovalen.

Ikatan hidrogen adalah suatu ikatan antara atom H yang mempunyai muatan positif parsial dengan atom lain yang bersifat elektromagnetik dan mempunyai sepasang elektron bebas dengan oktet lengkap. Kekuatan ikatan hidrogen bervariasi antara 1 – 10 kkal/mol, dengan rata-rata 5 kkal/mol. Ikatan kovalen terbentuk bila ada dua atom saling menggunakan sepasang elektron secara bersama-sama. Ikatan kovalen merupakan ikatan kimia yang paling kuat dengan rata-rata kekuatan ikatan 100 kkal/mol. Dengan kekuatan ikatan yang tinggi ini, pada suhu normal ikatan bersifat irreversibel dan hanya dapat pecah bila ada pengaruh katalisator enzim tertentu. Interaksi obat-reseptor melalui ikatan kovalen menghasilkan kompleks yang cukup stabil (Purwanto dan Susilowati, 2000).

Kemiripan antara bagian struktur penisilin dengan bagian tertentu dari asam N-asetil muramat, D-alanil-D-alanin dan L-alanin-D-asam glutamat, sering digunakan untuk menjelaskan mekanisme kerja antibiotika β -Laktam. Tahap akhir sintesis dinding sel bakteri adalah reaksi hubungan melintang (*cross linking*) antar unit-unit peptidoglikan nasen dengan katalisator enzim transpeptidase (Soekardjo dkk., 2000).

Karena turunan penisilin mempunyai bagian struktur yang mirip dengan gugus ujung D-alanil-D-alanin dari bagian pentapeptida unit peptidoglikan nasen, maka kedua turunan tersebut dapat menghambat kerja enzim transpeptidase dengan cara mengikat enzim, melalui ikatan kovalen, sehingga mencegah pembentukan dinding sel bakteri (Soekardjo dkk., 2000).

Pada tingkat molekul, mekanisme kerja antibiotika β -Laktam ditunjukkan oleh serangan nukleofil dari gugus hidroksil serin enzim transpeptidase pada karbonil karbon cincin β -Laktam yang bermuatan positif, sehingga terjadi hambatan biosintesis peptidoglikan. Akibatnya dinding sel menjadi lemah dan karena tekanan turgor dari dalam, dinding sel akan pecah atau lisis sehingga bakteri mengalami kematian (Soekardjo dkk., 2000).

Antibiotika β -Laktam hanya dapat membunuh bakteri pada fasa pertumbuhan dan tidak dapat mempengaruhi bakteri yang dalam bentuk tidak aktif dan persisten. Ini merupakan alasan mengapa pemberian suatu bakterisid pada penelitian, bersama-sama dengan senyawa bakteriostatik, seperti turunan amfenikol, sulfonamida atau tetrasiklin menjadi tidak rasional. Karena sel mamalia tidak mempunyai dinding, antibiotika β -Laktam dan antibiotika lain yang menghambat biosintesis dinding sel

bakteri bersifat sangat khas dan mempunyai toksisitas yang selektif terhadap sel bakteri (Soekardjo dkk., 2000).

Untuk menunjukkan kerja antibiotika β -Laktam pada bakteri Gram-negatif, seperti pada *Pasteurella multocida*, antibiotika β -Laktam pertama-tama harus menembus membran terluar selubung bakteri secara difusi pasif melalui saluran yang terbentuk oleh poli protein. Sesudah menembus membran terluar, antibiotika β -Laktam masuk melalui dinding sel, melewati ruang periplasma dan mencapai sasaran, yaitu enzim serin protease yang terdapat pada membran terdalam (sitoplasma). Enzim inilah yang bertanggungjawab terhadap biosintesis dinding sel. Pengaruh pada biosintesis dinding sel merupakan kerja bakterisid utama dari antibiotika β -Laktam.

Efek antibiotika β -Laktam terhadap bakteri adalah :

- (1) Menghentikan pertumbuhan bakteri, dengan cara menghambat biosintesis peptidoglikan
- (2) Menurunkan kelangsungan hidup sel
- (3) Membuat sel menjadi lisis

β -Laktamase adalah enzim yang dapat menginaktifkan antibiotika β -Laktam.

β -Laktamase telah dibuat pada beberapa spesies bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Pada bakteri Gram-negatif, enzim β -Laktamase terdapat pada ruang periplasma, suatu posisi yang strategis karena harus dapat dilewati oleh antibiotika β -Laktam sebelum antibiotika β -Laktam tersebut mencapai sasaran. Pada bakteri Gram-positif, enzim tersebut dilepaskan ke dalam medium dan merusak antibiotika β -Laktam sebelum mencapai sel (Jawetz *et.al.*, 2001; Soekardjo dkk., 2000).

Penghambat β -Laktamase adalah senyawa yang dapat menetralkan enzim β -Laktamase sehingga mencegah pengaktifan antibiotika β -Laktam dan tanpa halangan dapat secara bebas menunjukkan kerja bakterisidnya. Karena efek sinergis tersebut, penghambat β -Laktamase sering digunakan bersama-sama dengan antibiotika β -Laktam untuk mengatasi infeksi bakteri yang telah tahan. Contoh penghambat β -Laktam untuk mengatasi infeksi bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik β -Laktam: asam klavulanat, asam olivanat, sulbaktam dan pivsulbaktam (Soekardjo dkk., 2000).

Diantara berbagai dosis konsentrasi menunjukkan perbedaan yang bermakna, dimana F hitung $>$ F tabel 5% (Sig = ,000), sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima. Perlakuan dengan tanin pada kedua bakteri uji dan penisilin pada bakteri *Pasteurella multocida* dengan dosis terendah yang masih dapat membunuh bakteri yaitu 62,5 μ g/ml, yang tidak bermakna terhadap dosis 500 μ g/ml; 250 μ g/ml; 125 μ g/ml, dan bermakna terhadap dosis 32 μ g/ml; 16 μ g/ml; 8 μ g/ml, sedangkan perlakuan dengan penisilin pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan dosis terendah yang masih dapat membunuh bakteri yaitu 32 μ g/ml, yang tidak bermakna terhadap dosis 500 μ g/ml; 250 μ g/ml; 125 μ g/ml; 62,5 μ g/ml, dan bermakna terhadap dosis 16 μ g/ml; 8 μ g/ml.

Perbedaan hasil karena pengaruh berbagai dosis di atas disebabkan oleh meningkatnya konsentrasi senyawa tanin maupun penisilin, sehingga penembusan terhadap dinding sel dan membran sitoplasma dari sel bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* menjadi lebih besar, menyebabkan interaksi dengan

reseptor biologis semakin besar pula. Akibatnya aktivitas antibakterinya menjadi lebih besar pula. Beberapa bahan obat dapat melewati membran sel karena ada tekanan osmosa, yang disebabkan oleh perbedaan kadar antar membran. Pengangkutan ini berlangsung dari daerah dengan kadar tinggi ke daerah dengan kadar yang lebih rendah. Gerakan ini tidak memerlukan energi dan terjadi secara spontan (Purwanto dan Sondakh, 2000).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa : Terdapat perbedaan pengaruh dengan berbagai macam konsentrasi antara tanin dan penisilin terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* secara *in vitro*, dimana penisilin masih lebih baik aktifitasnya dalam membunuh kedua bakteri uji dibanding tanin, dan diantara kedua bahan uji aktifitasnya lebih kuat pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dibanding pada bakteri *Pasteurella multocida*.

7.2 Saran

- 7.2.1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme aktifitas antimikroba dari tanin.
- 7.2.2. Tanin dapat dikembangkan lebih lanjut untuk pembuatan antimikroba yang berasal dari tumbuhan.
- 7.2.3. Perlu dilakukan penelitian aktivitas antibakteri tanin terhadap bakteri patogen yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1980. **Pedoman Pengendalian Penyakit Hewan Menular**. Direktorat Kesehatan Hewan, Dirjen Peternakan, Jakarta, hlm. 37-48.
- Baron, E.J. and Finegold S.M., 1982. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 6th edition, Philadelphia: Mosby-Year Book, Inc., p.533-538.
- Baron, E.J., Linsey J.R., and Finegold S.M., 1994. **Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology**. 9th edition, Philadelphia: Mosby-Year Book, Inc., p.168-175.
- Barrow, G.I. and Feltham R.K.A., 1993. **Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria**. 3rdEd, Cambridge University Press. Cambridge, p.50-69.
- Berghe, D.A. and Vlietinck A.J., 1991. **Screening Methods For Antibacterial dan Antiviral Agent From Higher Plant**. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6, London Harchourt Brace Javanovich Publisher, p.47-58.
- Bibiana L.W., dan Hastowo S., 1992. **Mikrobiologi**. PAU Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor, hlm.33-36.
- Bibiana L.W., dan Hastowo S., 1994. **Analisis Mikrobiologi di Laboratorium**, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta, hlm. 67-73.
- Bruner, D.W. and Gillespie J.H., 1973. **Hagan's Infectious Diseases of Domestic Animal**. 6thEd, Cornell University Press, London, p.319.
- Cannell, R.J.P., 1998. **Natural Product Isolation**. Glaxo Wellcome Research & Development, Stevenage, Herts, UK, Human Press, Totowa, New Jersey. P. 354-355.
- Claus, 1974. **Pharmacognosy**. Lea and Febiger, Philadelphia, p.85.
- Davis, B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., and Ginsberg H.S., 1990. **Microbiology**. Fourth Ed., Lippincott Company, Philadelphia, p.609-610.
- Fardias, R, 1989. **Analisis Mikrobiologi Pangan**. Petunjuk Laboratorium, Dep. P. dan K. PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor, hlm. 36-37.
- Freeman, B.A., 1985. **Burrows Textbook of Microbiology**. Twenty-second Ed. W.B.Saunders Company, Japan, p.393-401.

- Ganiswara, S.G., Setiabudy R., Suyatna F.D. dan Purwastyastuti, 1995. **Farmakologi dan Terapi**. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hlm. 571-583 : 622 - 636.
- Hagan, W.A. and Bruner D.W., 1961. **The Infectious Diseases of Domestic Animal**. 4thEd., Bailliere, Tindall and Cox, London, p.132-135.
- Handijatno, D. dan Tyasningsih W., 1994. **Ilmu Penyakit Bakterial**. Staf Pengajar Lab.Bakteriologi dan Mikologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, hlm. 18-38.
- Harborne, J.B., and R.J. Grayer, 1994. **Flavonoids and Insects**. In J.B. Harborne, edition, *The Flavonoids, Advances in research since 1986*, Chapman and Hall, London, UK, p.589-618.
- Harismah, K., 2002. **Daun Jambu Biji untuk Sariawan**. <http://www.suaramerdeka.com> , hlm.1-3.
- Haslam, E., Lilley T.H. , Ya cai, Martin R., and Magnolato D., 1989. **Traditional herbal Medicines-The Role of Polyphenols**. *Planta Medica*, p.55, 1- 8.
- Haslam, E., 1996 **Natural polifenol (Vegetable Tanin) as drug Product, Possible Modes Action**. *J. Natural Product, America Chemical Society & American Society of Pharmacognosy*, p. 88 -- 92.
- Holt, J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., and Williams S.T., 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Ninth Ed., Williams & Wilkins, Baltimore Maryland, p.300-350.
- Jawetz, E., Melnick J.L., Adelberg E.A., 1996. **Mikrobiologi Kedokteran**. Edisi ke-20, EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, hlm. 218-228, 278
- Jawetz, E., Melnick J.L., Adelberg E.A., 2001. **Mikrobiologi Kedokteran**. Alih Bahasa oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Edisi ke-21, Penerbit Salemba Medika, Jakarta, hlm.327-341,416.
- Joklik, W.K., Willett H.P., Amos D.B., Wilfert C.M., 1992. **Zinsser Microbiology**. 20th Edition, Appleton & Lange, California, p.417-426, 600-602.
- Mahtuti, E.Y., 2003. **Pengaruh Daya Antimikroba Asam Tanat Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella typhi* Secara In Vitro**. Tesis Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Surabaya, hlm.45
- Merchant, I.A. and Packer R.A., 1961. **Veterinary Bacteriology and Virology**. 6thEd. Iowa State University Press, Ames, Iowa, p.301-303.

- Min Zhu, Philipson J.D., Greengrass P.M., Bowery N.E. and Ya Cai, 1997. **Plants Polyphenols: Biologically Active Coumpounds or Non-Selective Binders to Protein?**. *J. Phytochemistry*, p. 3,44, 441 – 557.
- Nagar, A.I., and Das R.K., 1981. **Basic Statistics**. Oxford University Press, Bombay, Calcuta, Madras, p. 190.
- Paxton, D.J., 1991. **Assay for Antifungal Activity: In method in Plant Biochemistry**. Vol. 6 , Harcliourt Brace Javanovich Publisher, London, p.33-46.
- Purwanto, B.T dan Sondakh R., 2000. Hubungan Struktur, Sifat Kimia Fisika dengan Proses Absorpsi, Distribusi dan Ekskresi Obat , dalam : **Kimia Medisinal**. Jilid 1, Airlangga University Press, Surabaya, hlm. 41.
- Purwanto dan Susilowati R., 2000. Hubungan Struktur, Ikatan Kimia dan Aktivitas Biologis Obat , dalam : **Kimia Medisinal**. Jilid 1, Airlangga University Press, Surabaya, hlm. 181 - 194.
- Radostits, O.M., Gay C.C., Blood D.C., and Hinchcliff K.W., 2000. **Veterinary Medicine 'A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses'**. Ninth Ed., W.B. Saunders Company Ltd, Philadelphia, p. 650-653, 708-710.
- Ratnasari, R., Sudarno dan Sarudji S., 1992. **Penyakit Bakterial**. Fakultas Kedokteran Iewan , Universitas Airlangga, Surabaya, hlm. 69-73.
- Reynolds, E.F. and Martindale J., 1996. **The Extra Pharmacopoeia**. 31st ed, Royal Pharmaceutical Society, London, p. 1074 – 1075.
- Rios, J.L, Recio M.C. and Villar A., 1988. **Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review of Literatur**, *Journal of Ethnopharmacology*, p. 23, 127-149.
- Rohman, A., 1997. **Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba dari Daun *Elaeocarpus grandiflorus* J.E. Smith**, Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, hlm. 62-63
- Sahm, D.F. and Washington II J.A., 1991. **Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution Methods**, in : Balows, A., (ed), **Manual of Clinical Microbiology** , 5th ed, American Society for *Microbiology*, Washington D.C., p. 203 – 208
- Sherris, J.C., Ryan K.J., Ray C.G., Plorde J.J., Corey L., Spizzen J. and Robinovitch M.R., 1984. **Medical Microbiology, An Introduction to Infectious Diseases**. Elsevier, New York, p.165 - 173.

- Soedarto, 2003. **Zoonosis Kedokteran**. Airlangga University Press, Surabaya, hlm. 1, 137-138, 172-173.
- Soekardjo, B., Hardjono S., dan Sondakh R., 2000. Hubungan Struktur Aktivitas Obat Antibiotika, dalam : **Kimia Medisinal**. Jilid 2, Airlangga University Press, Surabaya, hlm.112,113.
- Soetanto, T., Sondang M.S., dan Sukiman R., 2001. **Pola Kepekaan Mikroba Terhadap Antibiotik Yang lazim Digunakan Pada Kasus Diare Akut**. Artikel orisinil, Majalah Penyakit Infeksi Indonesia, Jakarta, hlm.4
- Trease, E.G and Evans W.C., 1978. **Pharmacognosy**. 20th ed, Lea & Febiger, Philadelphia, p. 376-380.
- Tyler, V.E. 1988. **Pharmacognosy**. 9th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, p.104-106.
- Volk and Wheeler, 1988. **Mikrobiologi Dasar**, Edisi ke-5, Jilid 2, Erlangga Jakarta, hlm. 102 – 103.
- World Health Organization, 1991. **Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology**. Geneva, p. 78-92.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Hasil Penelitian

Data Jumlah Koloni *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* dengan Berbagai Konsentrasi Tanin dan Penisilin ($\mu\text{g/ml}$)

No	Tanin ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> (10^5) (CFU/ml)	Jumlah koloni <i>Pasteurella multocida</i> (10^3) (CFU/ml)	Penisilin ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> (10^1) (CFU/ml)	Jumlah koloni <i>Pasteurella multocida</i> (10^2) (CFU/ml)
1.	PT1 I	0	0	PP1 I	0	0
2.	PT2 I	0	0	PP2 I	0	0
3.	PT3 I	0	0	PP3 I	0	0
4.	PT4 I	0	0	PP4 I	0	0
5.	PT5 I	71	36	PP5 I	0	43
6.	PT6 I	139	92	PP6 I	39	112
7.	PT7 I	210	145	PP7 I	108	195
8.	PT1 II	0	0	PP1 II	0	0
9.	PT2 II	0	0	PP2 II	0	0
10.	PT3 II	0	0	PP3 II	0	0
11.	PT4 II	0	0	PP4 II	0	0
12.	PT5 II	56	45	PP5 II	0	31
13.	PT6 II	120	99	PP6 II	44	87
14.	PT7 II	245	215	PP7 II	96	206
15.	PT1 III	0	0	PP1 III	0	0
16.	PT2 III	0	0	PP2 III	0	0
17.	PT3 III	0	0	PP3 III	0	0
18.	PT4 III	0	0	PP4 III	0	0
19.	PT5 III	81	58	PP5 III	0	69
20.	PT6 III	152	102	PP6 III	32	126
21.	PT7 III	237	255	PP7 III	82	233
22.	PT1 IV	0	0	PP1 IV	0	0
23.	PT2 IV	0	0	PP2 IV	0	0
24.	PT3 IV	0	0	PP3 IV	0	0
25.	PT4 IV	0	0	PP4 IV	0	0
26.	PT5 IV	44	29	PP5 IV	0	52
27.	PT6 IV	119	113	PP6 IV	59	98
28.	PT7 IV	251	142	PP7 IV	112	186

Data Transformasi (log 10) Jumlah Koloni *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* dengan Berbagai Konsentrasi Tanin dan Penisilin ($\mu\text{g/ml}$)

No	Tanin ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> (CFU/ml)	Jumlah koloni <i>Pasteurella multocida</i> (CFU/ml)	Penisilin ($\mu\text{g/ml}$)	Jumlah koloni <i>Streptococcus pyogenes</i> (CFU/ml)	Jumlah koloni <i>Pasteurella multocida</i> (CFU/ml)
1.	PT1 I	2	3	PP1 I	1	2
2.	PT2 I	2	3	PP2 I	1	2
3.	PT3 I	2	3	PP3 I	1	2
4.	PT4 I	2	3	PP4 I	1	2
5.	PT5 I	3.85	4.56	PP5 I	1	3.63
6.	PT6 I	4.14	4.96	PP6 I	2.59	4.05
7.	PT7 I	4.32	5.16	PP7 I	3.03	4.29
8.	PT1 II	2	3	PP1 II	1	2
9.	PT2 II	2	3	PP2 II	1	2
10.	PT3 II	2	3	PP3 II	1	2
11.	PT4 II	2	3	PP4 II	1	2
12.	PT5 II	3.75	4.65	PP5 II	1	3.49
13.	PT6 II	4.08	5	PP6 II	2.64	3.94
14.	PT7 II	4.39	5.33	PP7 II	2.98	4.31
15.	PT1 III	2	3	PP1 III	1	2
16.	PT2 III	2	3	PP2 III	1	2
17.	PT3 III	2	3	PP3 III	1	2
18.	PT4 III	2	3	PP4 III	1	2
19.	PT5 III	3.91	4.76	PP5 III	1	3.84
20.	PT6 III	4.18	5.01	PP6 III	2.51	4.1
21.	PT7 III	4.37	5.41	PP7 III	2.91	4.37
22.	PT1 IV	2	3	PP1 IV	1	2
23.	PT2 IV	2	3	PP2 IV	1	2
24.	PT3 IV	2	3	PP3 IV	1	2
25.	PT4 IV	2	3	PP4 IV	1	2
26.	PT5 IV	3.64	4.46	PP5 IV	1	3.72
27.	PT6 IV	4.08	5.05	PP6 IV	2.77	3.99
28.	PT7 IV	4.40	5.15	PP7 IV	3.05	4.27

Keterangan :

- PT1 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 500 $\mu\text{g/ml}$
 PT2 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 250 $\mu\text{g/ml}$
 PT3 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 125 $\mu\text{g/ml}$
 PT4 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 62,5 $\mu\text{g/ml}$
 PT5 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 32 $\mu\text{g/ml}$
 PT6 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 16 $\mu\text{g/ml}$
 PT7 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Tanin 8 $\mu\text{g/ml}$
 PP1 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 500 $\mu\text{g/ml}$
 PP2 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 250 $\mu\text{g/ml}$

- PP3 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 125 $\mu\text{g/ml}$
 PP4 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 62,5 $\mu\text{g/ml}$
 PP5 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 32 $\mu\text{g/ml}$
 PP6 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 16 $\mu\text{g/ml}$
 PP7 : Perlakuan dengan Konsentrasi akhir Penisilin 8 $\mu\text{g/ml}$
 I, II, III, IV : ulangan I, II, III dan IV

Data Jumlah Koloni *Streptococcus pyogenes* dan *Pasteurella multocida* Sebelum Pemberian Tanin dan Penisilin ($\mu\text{g/ml}$) Sebagai Kontrol Negatif

Ulangan	Kontrol Tanin		Kontrol Penisilin	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
1.	240×10^5	205×10^5	215×10^5	210×10^5
2.	235×10^5	211×10^5	249×10^5	206×10^5
3.	231×10^5	200×10^5	230×10^5	199×10^5
4.	223×10^5	215×10^5	201×10^5	203×10^5
Rata2	$232,25 \times 10^5$	$207,75 \times 10^5$	$223,75 \times 10^5$	$204,50 \times 10^5$

Lampiran 2. Hasil Analisis Statistik

Univariate Analysis of Variance

Warnings

Post hoc tests are not performed for BAKTERI because there are fewer than three groups.
Post hoc tests are not performed for BAHAN because there are fewer than three groups.

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
BAKTERI	Streptococcus pyogenes	56
	Pasteurella multocida	56
BAHAN	Tanin	56
	Penicillin	56
DOSIS	500 mikro gr/ml	16
	250 mikro gr/ml	16
	125 mikro gr/ml	16
	62,5 mikro gr/ml	16
	32 mikro gr/ml	16
	16 mikro gr/ml	16
	8 mikro gr/ml	16

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

BAKTERI	BAHAN	DOSIS	Mean	Std. Deviation	N
Streptococcus pyogenes	Tanin	500 mikro gr/ml	1.7500	.5000	4
		250 mikro gr/ml	1.7500	.5000	4
		125 mikro gr/ml	1.7500	.5000	4
		62,5 mikro gr/ml	1.7500	.5000	4
		32 mikro gr/ml	3.7878	.1169	4
		16 mikro gr/ml	4.1199	5.163E-02	4
		8 mikro gr/ml	4.3715	3.438E-02	4
		Total	2.7542	1.2380	28
	Penicillin	500 mikro gr/ml	1.0000	.0000	4
		250 mikro gr/ml	1.0000	.0000	4
		125 mikro gr/ml	1.0000	.0000	4
		62,5 mikro gr/ml	1.0000	.0000	4
		32 mikro gr/ml	1.0000	.0000	4
		16 mikro gr/ml	2.6276	.1112	4
		8 mikro gr/ml	2.9947	6.102E-02	4
		Total	1.5175	.8402	28

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

BAKTERI	BAHAN	DOSIS	Mean	Std. Deviation	N	
Streptococcus pyogenes	Total	500 mikro gr/ml	1.3750	.5175	8	
		250 mikro gr/ml	1.3750	.5175	8	
		125 mikro gr/ml	1.3750	.5175	8	
		62,5 mikro gr/ml	1.3750	.5175	8	
		32 mikro gr/ml	2.3939	1.4921	8	
		16 mikro gr/ml	3.3738	.8017	8	
		8 mikro gr/ml	3.6831	.7373	8	
		Total	2.1358	1.2200	56	
Pasteurella multocida	Tanin	500 mikro gr/ml	3.0000	.0000	4	
		250 mikro gr/ml	3.0000	.0000	4	
		125 mikro gr/ml	3.0000	.0000	4	
		62,5 mikro gr/ml	3.0000	.0000	4	
		32 mikro gr/ml	4.6088	.1292	4	
		16 mikro gr/ml	5.0053	3.702E-02	4	
		8 mikro gr/ml	5.2632	.1265	4	
		Total	3.8396	1.0053	28	
	Penicillin		500 mikro gr/ml	2.0000	.0000	4
			250 mikro gr/ml	2.0000	.0000	4
			125 mikro gr/ml	2.0000	.0000	4
			62,5 mikro gr/ml	2.0000	.0000	4
			32 mikro gr/ml	3.6699	.1459	4
			16 mikro gr/ml	4.0201	6.980E-02	4
			8 mikro gr/ml	4.3102	4.220E-02	4
			Total	2.8572	1.0245	28
Total		500 mikro gr/ml	2.5000	.5345	8	
		250 mikro gr/ml	2.5000	.5345	8	
		125 mikro gr/ml	2.5000	.5345	8	
		62,5 mikro gr/ml	2.5000	.5345	8	
		32 mikro gr/ml	4.1394	.5178	8	
		16 mikro gr/ml	4.5127	.5291	8	
		8 mikro gr/ml	4.7867	.5168	8	
		Total	3.3484	1.1212	56	
Total	Tanin	500 mikro gr/ml	2.3750	.7440	8	
		250 mikro gr/ml	2.3750	.7440	8	
		125 mikro gr/ml	2.3750	.7440	8	
		62,5 mikro gr/ml	2.3750	.7440	8	
		32 mikro gr/ml	4.1983	.4534	8	
		16 mikro gr/ml	4.5626	.4751	8	
		8 mikro gr/ml	4.8173	.4843	8	
		Total	3.2969	1.2444	56	

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

BAKTER-	BAHAN	DOSIS	Mean	Std. Deviation	N
Total	Penicillin	500 mikro gr/ml	1.5000	.5345	8
		250 mikro gr/ml	1.5000	.5345	8
		125 mikro gr/ml	1.5000	.5345	8
		62.5 mikro gr/ml	1.5000	.5345	8
		32 mikro gr/ml	2.3350	1.4303	8
		16 mikro gr/ml	3.3239	.7492	8
		8 mikro gr/ml	3.6524	.7048	8
		Total	2.1873	1.1483	56
Total	Total	500 mikro gr/ml	1.9375	.7719	16
		250 mikro gr/ml	1.9375	.7719	16
		125 mikro gr/ml	1.9375	.7719	16
		62.5 mikro gr/ml	1.9375	.7719	16
		32 mikro gr/ml	3.2667	1.4059	16
		16 mikro gr/ml	3.9432	.8812	16
		8 mikro gr/ml	4.2349	.8385	16
		Total	2.7421	1.3158	112

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

F	df1	df2	Sig.
6.835	27	84	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

- a. Design: BAKTERI+BAHAN+DOSIS+BAKTERI * BAHAN+BAKTERI * DOSIS+BAHAN * DOSIS+BAKTERI * BAHAN * DOSIS

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	1031.022 ^a	28	36.822	941.047	.000
BAKTERI	41.169	1	41.169	1052.136	.000
BAHAN	34.472	1	34.472	880.983	.000
DOSIS	104.572	6	17.429	445.415	.000
BAKTERI * BAHAN	.453	1	.453	11.565	.001
BAKTERI * DOSIS	1.328	6	.221	5.655	.000
BAHAN * DOSIS	3.232	6	.539	13.767	.000
BAKTERI * BAHAN * DOSIS	3.653	6	.609	15.559	.000
Error	3.287	84	3.913E-02		
Total	1034.309	112			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .996)

Estimated Marginal Means

Kajian Aktivitas Tanin Dengan Penisilin Terhadap Bakteri Streptococcus Pyogenes ...

1. BAKTERI

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

BAKTERI:	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Streptococcus pyogenes	2.136	.026	2.083	2.188
Pasteurela multocida	3.348	.026	3.296	3.401

2. BAHAN

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

BAHAN	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Tanin	3.297	.026	3.244	3.349
Penicillin	2.187	.026	2.135	2.240

3. DOSIS

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
500 mikro gr/m	1.938	.049	1.839	2.036
250 mikro gr/m	1.938	.049	1.839	2.036
125 mikro gr/m	1.938	.049	1.839	2.036
62.5 mikro gr/m	1.938	.049	1.839	2.036
32 mikro gr/m	3.267	.049	3.168	3.365
16 mikro gr/m	3.943	.049	3.845	4.042
8 mikro gr/m	4.235	.049	4.137	4.333

4. BAKTERI * BAHAN

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

BAKTERI	BAHAN	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Streptococcus pyogenes	Tanin	2.754	.037	2.680	2.829
	Penicillin	1.517	.037	1.443	1.592
Pasteurela multocida	Tanin	3.840	.037	3.765	3.914
	Penicillin	2.857	.037	2.783	2.932

5. BAKTERI * DOSIS

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

BAKTERI	DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Streptococcus pyogenes	500 mikro gr/ml	1.375	.070	1.236	1.514
	250 mikro gr/ml	1.375	.070	1.236	1.514
	125 mikro gr/ml	1.375	.070	1.236	1.514
	62,5 mikro gr/ml	1.375	.070	1.236	1.514
	32 mikro gr/ml	2.394	.070	2.255	2.533
	16 mikro gr/ml	3.374	.070	3.235	3.512
	8 mikro gr/ml	3.683	.070	3.544	3.822
Pasteurella multocida	500 mikro gr/ml	2.500	.070	2.361	2.639
	250 mikro gr/ml	2.500	.070	2.361	2.639
	125 mikro gr/ml	2.500	.070	2.361	2.639
	62,5 mikro gr/ml	2.500	.070	2.361	2.639
	32 mikro gr/ml	4.139	.070	4.000	4.278
	16 mikro gr/ml	4.513	.070	4.374	4.652
	8 mikro gr/ml	4.787	.070	4.648	4.926

6. BAHAN * DOSIS

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

BAHAN	DOSIS	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Tanin	500 mikro gr/ml	2.375	.070	2.236	2.514
	250 mikro gr/ml	2.375	.070	2.236	2.514
	125 mikro gr/ml	2.375	.070	2.236	2.514
	62,5 mikro gr/ml	2.375	.070	2.236	2.514
	32 mikro gr/ml	4.198	.070	4.059	4.337
	16 mikro gr/ml	4.563	.070	4.424	4.702
	8 mikro gr/ml	4.817	.070	4.678	4.956
Penicillin	500 mikro gr/ml	1.500	.070	1.361	1.639
	250 mikro gr/ml	1.500	.070	1.361	1.639
	125 mikro gr/ml	1.500	.070	1.361	1.639
	62,5 mikro gr/ml	1.500	.070	1.361	1.639
	32 mikro gr/ml	2.335	.070	2.196	2.474
	16 mikro gr/ml	3.324	.070	3.185	3.463
	8 mikro gr/ml	3.652	.070	3.513	3.792

7. BAKTERI * BAHAN * DOSIS

Dependent variable Jumlah bakteri dengan transformasi

BAKTER:	BAHAN	DOSIS	Mean	Std. Error
Streptococcus pyogenes	Tanin	500 mikro gr/ml	1.750	.099
		250 mikro gr/ml	1.750	.099
		125 mikro gr/ml	1.750	.099
		62,5 mikro gr/ml	1.750	.099
		32 mikro gr/ml	3.788	.099
		16 mikro gr/ml	4.120	.099
		8 mikro gr/ml	4.371	.099
	Penicillin	500 mikro gr/ml	1.000	.099
		250 mikro gr/ml	1.000	.099
		125 mikro gr/ml	1.000	.099
		62,5 mikro gr/ml	1.000	.099
		32 mikro gr/ml	1.000	.099
		16 mikro gr/ml	2.628	.099
		8 mikro gr/ml	2.995	.099
Pasteureia multocida	Tanin	500 mikro gr/ml	3.000	.099
		250 mikro gr/ml	3.000	.099
		125 mikro gr/ml	3.000	.099
		62,5 mikro gr/ml	3.000	.099
		32 mikro gr/ml	4.609	.099
		16 mikro gr/ml	5.005	.099
		8 mikro gr/ml	5.263	.099
	Penicillin	500 mikro gr/ml	2.000	.099
		250 mikro gr/ml	2.000	.099
		125 mikro gr/ml	2.000	.099
		62,5 mikro gr/ml	2.000	.099
		32 mikro gr/ml	3.670	.099
		16 mikro gr/ml	4.020	.099
		8 mikro gr/ml	4.310	.099

7. BAKTERI * BAHAN * DOSIS

Dependent variable Jumlah bakteri dengan transformasi

BAKTERI	BAHAN	DOSIS	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Streptococcus pyogenes	Tanin	500 mikro gr/ml	1.553	1.947
		250 mikro gr/ml	1.553	1.947
		125 mikro gr/ml	1.553	1.947
		62,5 mikro gr/ml	1.553	1.947
		32 mikro gr/ml	3.591	3.985
		16 mikro gr/ml	3.923	4.317
		8 mikro gr/ml	4.175	4.568
	Penicillin	500 mikro gr/ml	.803	1.197
		250 mikro gr/ml	.803	1.197
		125 mikro gr/ml	.803	1.197
		62,5 mikro gr/ml	.803	1.197
		32 mikro gr/ml	.803	1.197
		16 mikro gr/ml	2.431	2.824
		8 mikro gr/ml	2.798	3.191
Pasteurella multocida	Tanin	500 mikro gr/ml	2.803	3.197
		250 mikro gr/ml	2.803	3.197
		125 mikro gr/ml	2.803	3.197
		62,5 mikro gr/ml	2.803	3.197
		32 mikro gr/ml	4.412	4.806
		16 mikro gr/ml	4.809	5.202
		8 mikro gr/ml	5.066	5.460
	Penicillin	500 mikro gr/ml	1.803	2.197
		250 mikro gr/ml	1.803	2.197
		125 mikro gr/ml	1.803	2.197
		62,5 mikro gr/ml	1.803	2.197
		32 mikro gr/ml	3.473	3.867
		16 mikro gr/ml	3.823	4.217
		8 mikro gr/ml	4.114	4.507

Post Hoc Tests

DOSIS

Multiple Comparisons

Dependent Variable .Jumlah bakteri dengan transformasi

LSD

(I) DOSIS	(J) DOSIS	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
500 mikro gr/ml	250 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	125 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	62.5 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	32 mikro gr/ml	-1.4682	-1.1901
	16 mikro gr/ml	-2.1448	-1.8666
	8 mikro gr/ml	-2.4364	-2.1583
250 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	125 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	62.5 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	32 mikro gr/ml	-1.4682	-1.1901
	16 mikro gr/ml	-2.1448	-1.8666
	8 mikro gr/ml	-2.4364	-2.1583
125 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	250 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	62.5 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	32 mikro gr/ml	-1.4682	-1.1901
	16 mikro gr/ml	-2.1448	-1.8666
	8 mikro gr/ml	-2.4364	-2.1583
62.5 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	250 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	125 mikro gr/ml	-.1391	.1391
	32 mikro gr/ml	-1.4682	-1.1901
	16 mikro gr/ml	-2.1448	-1.8666
	8 mikro gr/ml	-2.4364	-2.1583
32 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	1.1901	1.4682
	250 mikro gr/ml	1.1901	1.4682
	125 mikro gr/ml	1.1901	1.4682
	62.5 mikro gr/ml	1.1901	1.4682
	16 mikro gr/ml	-.8156	-.5375
	8 mikro gr/ml	-1.1073	-.8291
16 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	1.8666	2.1448
	250 mikro gr/ml	1.8666	2.1448
	125 mikro gr/ml	1.8666	2.1448
	62.5 mikro gr/ml	1.8666	2.1448
	32 mikro gr/ml	.5375	.8156
	8 mikro gr/ml	-.4307	-.1526
8 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	2.1583	2.4364
	250 mikro gr/ml	2.1583	2.4364
	125 mikro gr/ml	2.1583	2.4364
	62.5 mikro gr/ml	2.1583	2.4364
	32 mikro gr/ml	.8291	1.1073
	16 mikro gr/ml	.1526	.4307

Based on observed means

* The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Jumlah bakteri dengan transformasi

LSD

(I) DOSIS	(J) DOSIS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
500 mikro gr/ml	250 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	125 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	62.5 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	32 mikro gr/ml	-1.3292*	6.994E-02	.000
	16 mikro gr/ml	-2.0057*	6.994E-02	.000
	8 mikro gr/ml	-2.2974*	6.994E-02	.000
250 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	125 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	62.5 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	32 mikro gr/ml	-1.3292*	6.994E-02	.000
	16 mikro gr/ml	-2.0057*	6.994E-02	.000
	8 mikro gr/ml	-2.2974*	6.994E-02	.000
125 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	250 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	62.5 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	32 mikro gr/ml	-1.3292*	6.994E-02	.000
	16 mikro gr/ml	-2.0057*	6.994E-02	.000
	8 mikro gr/ml	-2.2974*	6.994E-02	.000
62.5 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	250 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	125 mikro gr/ml	.0000	6.994E-02	1.000
	32 mikro gr/ml	-1.3292*	6.994E-02	.000
	16 mikro gr/ml	-2.0057*	6.994E-02	.000
	8 mikro gr/ml	-2.2974*	6.994E-02	.000
32 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	1.3292*	6.994E-02	.000
	250 mikro gr/ml	1.3292*	6.994E-02	.000
	125 mikro gr/ml	1.3292*	6.994E-02	.000
	62.5 mikro gr/ml	1.3292*	6.994E-02	.000
	16 mikro gr/ml	-.6766*	6.994E-02	.000
	8 mikro gr/ml	-.9682*	6.994E-02	.000
16 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	2.0057*	6.994E-02	.000
	250 mikro gr/ml	2.0057*	6.994E-02	.000
	125 mikro gr/ml	2.0057*	6.994E-02	.000
	62.5 mikro gr/ml	2.0057*	6.994E-02	.000
	32 mikro gr/ml	.6766*	6.994E-02	.000
	8 mikro gr/ml	-.2916*	6.994E-02	.000
8 mikro gr/ml	500 mikro gr/ml	2.2974*	6.994E-02	.000
	250 mikro gr/ml	2.2974*	6.994E-02	.000
	125 mikro gr/ml	2.2974*	6.994E-02	.000
	62.5 mikro gr/ml	2.2974*	6.994E-02	.000
	32 mikro gr/ml	.9682*	6.994E-02	.000
	16 mikro gr/ml	-.2916*	6.994E-02	.000

Based on observed means

T-Test

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Tanin Streptococcus pyogenes	6205.0000	4	346.1617	173.0808
	Penicillin Streptococcus pyogenes	211.4286	4	33.5030	16.7515
Pair 2	Tanin Pasteurela multocida	48107.1429	4	9547.8565	4773.9283
	Penicillin Pasteurela multocida	5192.8571	4	669.8055	334.9028

Paired Samples Correlations

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	Tanin Streptococcus pyogenes & Penicillin Streptococcus pyogenes	4	-.890	.110
Pair 2	Tanin Pasteurela multocida & Penicillin Pasteurela multocida	4	.682	.318

Paired Samples Test

		Paired Differences				
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
Pair 1	Tanin Streptococcus pyogenes - Penicillin Streptococcus pyogenes	5993.5714	376.2770	188.1385	5394.8308	6592.3120
Pair 2	Tanin Pasteurela multocida - Penicillin Pasteurela multocida	42914.286	9103.9350	4551.9675	28427.894	57400.678

Paired Samples Test

		t	df	Sig. (2-tailed)
Pair 1	Tanin Streptococcus pyogenes - Penicillin Streptococcus pyogenes	31.857	3	.000
Pair 2	Tanin Pasteurela multocida - Penicillin Pasteurela multocida	9.428	3	.003