

Efek Antibakteri Kombinasi Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dengan Amoksisilin pada *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli* secara *in vitro*

Sonia Lugita Sari, Reza Hakim*, Erna Sulistyowati
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Daun teh hijau (*C.sinensis*) dapat digunakan sebagai pengobatan infeksi bakteri karena mengandung senyawa aktif antibakteri. Resistensi antibiotik disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang tidak sesuai indikasi, dan tidak sesuai dosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat amoksisilin yang dikombinasikan dengan daun *C.sinensis* (ekstrak metanolik,dekokta) terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

Metode: Daya hambat tunggal dan kombinasi dosis rendah maupun dosis tinggi diukur melalui uji *Zone of inhibition* (ZOI) dengan metode *agar well diffusion*. Interpretasi hasil ZOI kombinasi dilakukan menggunakan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST). Analisa statistik yang digunakan adalah *Kolmogorov-Smirnov* dilanjutkan uji non-parametrik *Mann-Whitney Test* dengan nilai signifikansi $p<0.05$.

Hasil: Kombinasi ekstrak metanolik daun *C.sinensis* dengan amoksisilin (EMCA) dan kombinasi dekokta daun *C.sinensis* dengan amoksisilin (DCA) mampu menghambat *S.aureus* secara signifikan ($p<0.05$) yaitu berturut-turut 12.3 ± 2.9 dan 21.6 ± 1.1 mm dibandingkan perlakuan tunggal amoksisilin dosis rendah (5.7 ± 4.9), EMC dosis tinggi dan rendah (9.7 ± 0.6 mm; 8.3 ± 0.6 mm), maupun DC semua dosis (0 mm). Kombinasi DCA pada *E.coli* masih menunjukkan adanya zona hambat sedangkan kombinasi EMCA tidak menghambat *E.coli*.

Kesimpulan: Kombinasi EMCA dosis rendah pada *S.aureus* bersifat sinergis namun pada DCA bersifat antagonis. Kombinasi EMCA dan DCA pada *E.coli* bersifat tidak berbeda signifikan dengan pemberian tunggalnya kecuali pada DCA (DC+A+;DC-A+)

Kata kunci: *Camellia sinensis*, Amoksisilin, resistensi antibiotik, *S.aureus*, *E.coli*

*Korespondensi :

Reza Hakim. Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang. Jl. MT Haryono 193, Malang, Jawa Timur.

E-mail : rezahakim78@gmail.com

Anti-bacterial Effects on Greean Tea Leaf (*Camellia sinensis*) with Amoxicillin Combination towards *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* using *in vitro*

Sonia Lugita Sari, Reza Hakim*, Erna Sulistyowati
Faculty of Medicine Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: Green tea leaf (*C.sinensis*) can be used as a treatment of bacterial infection because it contains of anti-bacterial compounds. Antibiotics resistance is caused by using antibiotics that does not suit with indication, and does not suit with the dose. This study was purposed to define the anti-microbial activity of amoxicicillin combined with *C. sinensis* leaf (methanolic extract,decoction) against *S. aureus* and *E. coli*.

Method: The antibacterial activities (single,combined) low dose were measured through *zone of inhibition* (ZOI) test with *agar well diffusion* method. The result of the ZOI combinations were interpreted with the *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test* (AZDAST). The data was analysed with *Kolmogorov-Smirnov*, followed by a non-parametric test *Mann-Whitney Test*, with the value of significance on $p<0.05$.

Results: Combination of Methanolic extract of *C. sinensis* leaf with Amoxicicillin (EMCA) and combination of Decoction of *C. sinensis* leaf with Amoxicicillin (DCA) defined on *S. aureus* ($p<0.05$) I.e 12.3 ± 2.9 mm and 21.6 ± 1.1 mm , respectively, were compared to amoxicicillin low dose (5.7 ± 4.93), EMC high and low doses (9.7 ± 0.57 mm; 8.3 ± 0.57 mm) and DC all doses (0 mm). DCA combination defined on *E.coli* while the EMCA combination did not define on *E.coli*

Conclusion: Low dose EMCA combination on *S.aureus* is synergistics interaction but in DCA is antagonistics interaction. EMCA and DCA combination are not distinguishable interaction except in DCA (DC+A+;DC-A+) on *E.coli*

Keywords: *Camellia sinensis*, Amoxicicillin, antibiotic resistance, *S.aureus*, *E.coli*

*Correspondences : Reza Hakim. Faculty of Medicine, Islamic University of Malang. MT Haryono St. 193, Malang, East Java. E-mail : rezahakim78@gmail.com

PENDAHULUAN

Resistensi bakteri terhadap antibiotik disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang tidak sesuai indikasi, tidak sesuai dosis, dan pemberian dalam jangka waktu yang lama. sehingga efektivitasnya akan berkurang. Kuman-kuman yang resisten terhadap antibiotik telah menjadi masalah kesehatan yang sangat besar¹. Resistensi *Escherichia coli* terhadap amoksisilin di air sungai menunjukkan hasil 80% dan air rumah tangga 66,7% dan terdapat peningkatan resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap amoksisilin menggunakan metode adaptif gradual^{2,3}.

Penanganan bakteri yang resisten membutuhkan herbal yang mengandung zat antimikroba untuk memodulasi antibiotik. Salah satu herbal yang memiliki efek antimikroba adalah *Camellia sinensis* dengan kandungan katekin (polifenol) yang tinggi. Beberapa kandungan kimia yang dimiliki oleh teh hijau yang berperan sebagai antibiotik yaitu alkaloid, saponin, tanin, katekin polifenol⁴. Selain itu menurut penelitian Pujar *et al.*, (2011) teh hijau juga mengandung konsentrasi katekin dan turunannya yang tinggi. Dua senyawa turunan katekin yang paling tinggi tersebut yakni epigallocatekingallat (EGCG) dan epikatekingallat (ECG) yang diketahui dapat mengurangi resistensi antibiotika golongan beta-laktam⁵.

Aininah (2018) menyatakan kombinasi ekstrak etanolik daun *Camellia sinensis* dan amoksisilin mampu menghambat *Staphylococcus aureus* secara signifikan⁶. Amelia, dkk (2012) menyatakan *Camellia sinensis* memiliki efek antibakteri yang signifikan pada *S. aureus* dan *E.coli*⁷. Menurut Robinson (1995) metode ekstraksi menggunakan pelarut air dan metanol pada *Camellia sinensis* dapat mengeluarkan komponen zat aktif pada *Camellia sinensis* seperti katekin. Senyawa katekin dalam *Camellia sinensis* mengandung 2 cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari 1 dimana gugus hidroksil adalah senyawa fenol yang memiliki tingkat kelarutan dalam air yang tinggi karna bersifat polar⁸. Menurut Lenny (2006) pelarut metanol merupakan pelarut yang bersifat universal yang mampu mengikat semua komponen kimia yang terdapat pada tumbuhan bahan alam, baik yang bersifat non polar, semi polar, dan polar. Metanol merupakan cairan penyari yang mudah masuk kedalam sel sehingga metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut dan senyawa akan terekstraksi sempurna⁹.

Dapat disimpulkan belum diketahui efek/kombinasi amoksisilin dan ekstrak metanolik *Camellia sinensis* serta efek/kombinasi amoksisilin dan ekstrak dekokta *Camellia sinensis* sehingga perlu dilakukan penelitian efek/kombinasi dari keduanya.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *in vitro* yang dilaksanakan secara eksperimental laboratorium, untuk mengetahui efek antibakteri kombinasi daun *C.sinensis* dengan amoksisilin terhadap *Zone of Inhibition* (ZOI) *S.aureus* dan *E.coli*. Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Mei 2019 di Laboratorium Herbal Biomedik dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Pembuatan Ekstraksi Daun *C.sinensis*

Prosedur pembuatan ekstrak daun *C.sinensis* dengan metode maserasi dan dekoktasi diawali dengan mempersiapkan simplisia serbuk daun *C.sinensis* dari UPT Materia Medika, Batu dengan nomer sertifikasi surat 074/081A/102.7/2019.

Metode maserasi dilakukan dengan tahapan simplisia ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 40 gram dan dicampurkan dengan pelarut metanol 96% sebanyak 400 ml untuk direndam didalam Erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan alumunium foil lalu dimasukkan dalam *shaker water bath* dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah itu hasil ekstrak disaring dengan *vacum buchner* dan dievaporasi pada suhu 45°C. Selanjutnya, ekstrak dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C. Bila ekstrak telah kering dilarutkan kembali dengan metanol 60% hingga diperoleh ekstrak cair^{10,11,12}

Pembuatan dekokta daun *C.sinensis* dilakukan melalui tahapan penimbangan serbuk simplisia daun *C.sinensis* menggunakan neraca digital kemudian dilarutkan dalam aquades atau air dengan perbandingan 1:10. Selanjutnya larutan dipanaskan di dalam panci dekokta selama 30 menit dengan suhu 90°C. Larutan dekokta daun *C.sinensis* kemudian diangkat dan disaring dengan *vacuum buchner*¹³

Pembiakan dan Pembuatan Bakteri *S.aureus* dan *E.coli*

S.aureus dan *E.coli* yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Malang yang diambil dari isolat klinis, selanjutnya dilakukan inokulasi bakteri dalam media *Nutrient Agar* (NA), kemudian diinkubasi selama ± 18-24 jam pada suhu 37°C¹⁴

Bakteri hasil inokulasi sebelumnya dilarutkan dengan NaCl 0.9% steril dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks. Selanjutnya larutan diambil menggunakan mikropipet dan dibaca dengan spektrofotometer pada gelombang 600nm¹⁵. Hasil absorbansi kemudian dilakukan pengenceran (dilusi) dengan NaCl 0.9% sesuai rumus berikut :

$$\text{volume total dilusi} = \frac{\text{abs.sampel}}{0.2} \times \text{vol.sampel} \dots (15)$$

Pembuatan Suspensi Amoksisilin

Tahapan ini diawali dengan sediaan serbuk amoksisilin murni ditimbang sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dalam 10 ml aquades steril¹⁶

Pembuatan Media

Nutrient Agar (NA) dilarutkan dalam aquades steril dengan perbandingan 1:50 kemudian di autoklaf. Setelah steril suhu media diukur menggunakan termometer cahaya, apabila suhu kurang dari 50°C suspensi bakteri yang telah dibuat pada tahap sebelumnya dimasukkan sebanyak 1% (5 ml dalam 500 ml media), selanjutnya media digoyangkan hingga suspensi bakteri tercampur rata lalu dituang ke dalam cawan petri (20-25ml)¹⁵.

Uji Zona Hambat (Zona Inhibisi)

Uji zona inhibisi dilakukan dengan metode *agar well diffusion*, diawali dengan melakukan persiapan media yang telah ditambahkan dengan suspensi *S.aureus* dan *E.coli* pada tahap sebelumnya. Kemudian pada tiap media dibuat 10 lubang berdiameter sekitar 6 mm menggunakan *cork borer*¹⁷. Metode ini menggunakan konsentrasi amoksisilin 100, ekstrak metanol daun *C.sinensis*, dan dekokta daun *C.sinensis* konsentrasi 10%. Pada tiap lubang dimasukkan sampel sebanyak 30µl untuk uji ZOI tunggal, dan masing- masing 15µl untuk ZOI kombinasi. Media tersebut dibagi menjadi lima kelompok yakni ekstrak metanolik daun *C.sinensis* tunggal (EMC), dekokta daun *C.sinensis* tunggal (DC), larutan amoksisilin tunggal (A), kombinasi larutan ekstrak metanolik daun *C.sinensis* dan amoksisilin (EMCA), serta kombinasi dekokta daun *C.sinensis* dan larutan amoksisilin (DCA). Selanjutnya media diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dengan posisi cawan petri terbalik¹⁸.

Apabila didapatkan zona bening disekitar lubang, maka hal tersebut menandakan bahan coba memiliki daya hambat pertumbuhan bakteri. Pengukuran diameter ZOI dilakukan menggunakan penggaris dengan satuan millimeter (mm)¹⁸. Tingkat kekuatan daya hambat bakteri menurut Davis dan Stout (1971) yaitu sangat kuat (diameter ZOI >20 mm), kuat (diameter ZOI 10-20 mm), sedang (diameter ZOI 5-10 mm), dan lemah (diameter ZOI <5 mm)²⁰.

Analisa Data Statistik

Data uji ZOI yang diperoleh selanjutnya diolah menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) untuk mendapatkan rerata dan standar deviasi. Didapatkan data penelitian tidak terdistribusi normal, sehingga dilanjutkan dengan uji non parametrik *Mann-Whitney Test* untuk mengetahui perbandingan hasil ZOI kombinasi dengan ZOI tunggalnya.

Interpretasi Interaksi Data Statistik

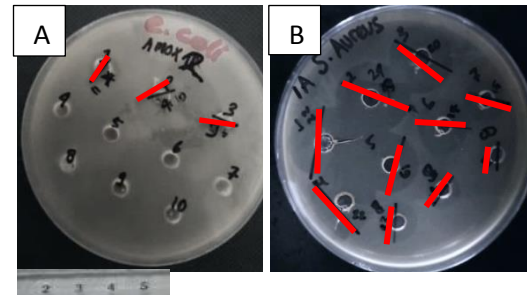
Interpretasi dilakukan dengan metode AZDAST. Apabila A adalah antibiotik dan B adalah herbal, maka

kombinasi dikatakan sinergis jika $AB > A$ dan B atau AA dan atau BB , potensiasi jika $A/B = 0$ dan $AB > A$ dan B atau AA dan atau BB , aditif jika $AB = A$ dan atau BB atau A dan B , antagonis jika $AB < A$ dan B atau AA dan atau BB , serta *not distinguishable* jika $AB = A$ atau B , $A+B$ lebih besar dari A dan B dan lebih besar atau kecil dari $A+A$ atau $B+B$ ²¹.

HASIL DAN ANALISA DATA

Zona Inhibisi Amoksisilin terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil uji ZOI Amoksisilin ditunjukkan pada Gambar 3 dan Tabel 3.



Gambar 1. Hasil ZOI tunggal amoksisilin terhadap *S.aureus* (A) dan *E.coli* (B)

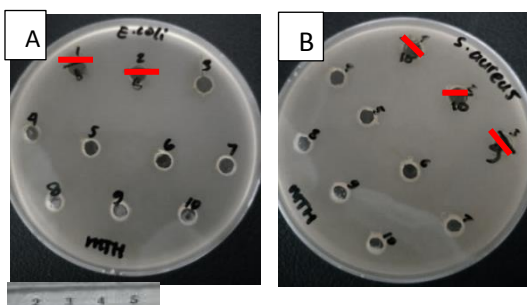
Tabel 1. Rerata (3x Ulangan) Zona Hambat Tunggal Antibiotik Amoksisilin terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Hole	Dilusi (Konsentrasi)	Ulangan (n)	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm)	
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	1/1	3	21.3 $\pm$ 1.2	10.8 $\pm$ 0.3
2	1/2	3	21.6 $\pm$ 2.1	9.5 $\pm$ 1.2
3	1/4	3	19.7 $\pm$ 0.6	9.0 $\pm$ 0.0
4	1/8	3	19.7 $\pm$ 2.1	0,0 $\pm$ 0,0
5	1/16	3	18.0 $\pm$ 1.0	0,0 $\pm$ 0,0
6	1/32	3	15.7 $\pm$ 1.5	0,0 $\pm$ 0,0
7	1/64	3	14.3 $\pm$ 1.2	0,0 $\pm$ 0,0
8	1/128	3	11.3 $\pm$ 2.9	0,0 $\pm$ 0,0
9	1/256	3	10,0 $\pm$ 2.0	0,0 $\pm$ 0,0
10	1/512	3	5.7 $\pm$ 4.9	0,0 $\pm$ 0,0

Tabel 1. menunjukkan bahwa amoksisilin memiliki daya hambat yang lebih kuat terhadap *S.aureus* dibandingkan dengan *E.coli*. Pada dilusi pertama *S.aureus* menunjukkan diameter zona hambat 21.3 $\pm$ 1.2 dan *E.coli* menunjukkan diameter zona hambat 10.8 $\pm$ 0.3s. Pada *S. aureus* masih terdapat zona hambat di konsentrasi 1/8 sedangkan pada *E. coli* sudah tidak didapatkan zona hambat.

Zona Inhibisi Ekstrak Metanolik Daun *C.sinensis* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil ZOI EMC ditunjukkan pada Gambar 2 dan Tabel 2.



Gambar 2. Hasil ZOI tunggal Ekstrak Metanolik *C.sinensis* terhadap *S.aureus* (A) dan *E.coli* (B)

Tabel 2. Rata-rata diameter ZOI tunggal Ekstrak Metanolik daun *C.sinensis* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

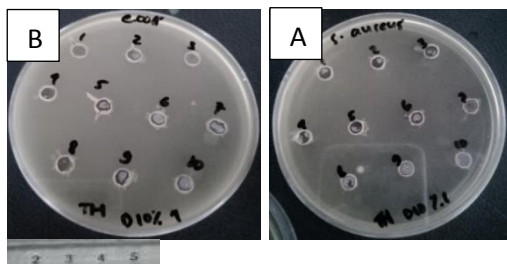
Hole	Dilusi	Ulangan (n)	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm)	
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	1	3	9.7±0.6	8,3±0,6
2	½	3	9.3 ± 0.6	8.0 ± 0.0
3	¼	3	8.7 ± 0.6	0.0 ± 0.0
4	1/8	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5	1/16	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6	1/32	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
7	1/64	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
8	1/128	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9	1/256	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10	1/512	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Keterangan : >20mm daya hambat sangat kuat, 10-20 daya hambat kuat, 5-10 daya hambat sedang, ≤5 daya hambat lemah

Tabel 2. menunjukkan bahwa ekstrak metanolik daun teh hijau (*Camellia sinensis*) lebih efektif terhadap *S.aureus* dibandingkan dengan *E.coli*. Pada dilusi pertama *S.aureus* menunjukkan diameter zona hambat 9.7±0.57 dan *E.coli* menunjukkan diameter zona hambat 8.3±0.57. Pada *S. aureus* masih terdapat zona hambat di konsentrasi 1/4 sedangkan pada *E. coli* sudah tidak didapatkan zona hambat.

Zona Inhibisi Dekokta Daun *C.sinensis* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

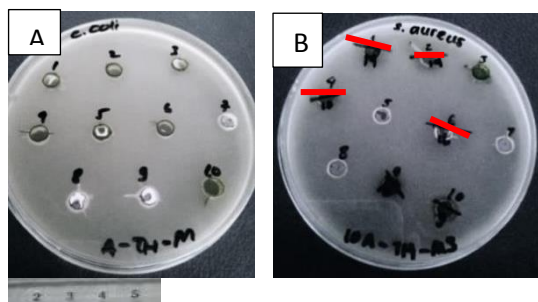
Hasil ZOI DC ditunjukkan pada **Gambar 3 dan Tabel 3.**



Gambar 3. Hasil ZOI tunggal Dekokta daun *C.sinensis* terhadap *S.aureus* (A) dan *E.coli* (B)

ZOI Kombinasi Amoksisilin dengan Ekstrak Metanolik Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

Hasil ZOI kombinasi ekstrak metanolik daun *C.sinensis* dengan Amoksisilin (EMCA) ditunjukkan pada **Gambar 4 dan Tabel 4**



Gambar 4. Hasil Zona Hambat Ekstrak Metanolik Daun Teh hijau pada *E. coli* (A), *S. aureus* (B)

Tabel 3. Rata-rata diameter ZOI tunggal Dekokta daun *C.sinensis* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hole	Dilusi	Ulangan (n)	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm)	
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	1	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	½	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3	¼	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
4	1/8	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5	1/16	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6	1/32	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
7	1/64	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
8	1/128	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9	1/256	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10	1/512	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Keterangan : >20mm daya hambat sangat kuat, 10-20 daya hambat kuat, 5-10 daya hambat sedang, ≤5 daya hambat lemah

Tabel 3. menunjukkan bahwa dekokta *C.sinensis* pada *S.aureus* tidak menunjukkan adanya zona hambat begitu juga dekokta *C.sinensis* pada *E.coli* juga tidak menunjukkan adanya zona hambat

Tabel 4. Rerata (3x Ulangan) Diameter ZOI Kombinasi Ekstrak Metanolik Daun *C. sinensis* dengan Amoksisilin pada *S.aureus* dan *E.coli*

Bakteri	Kelompok kombinasi	Dilusi [EMC],[A]	Rata-rata ZOI (mm) ± SD	Nilai Sig
<i>S.aureus</i>	EMC+,A+	[1],[1]	12.3 ± 2,9	0.04; 0.26
	EMC-,A+	[1/4],[1]	13.0 ± 2,6	0.07; 0.04
	EMC+,A-	[1],[1/64]	3.0 ± 5,1	0.79; 0.11
	EMC-,A-	[1/4],[1/64]	9.3 ± 1.1	0.06; 0.36
	EMC+	[1/1]	9.3±1.1	-
	EMC-	[1/2]	8.7±0.6	-
	A+	[1/1]	16.0±1.0	-
	A-	[1/64]	2.7±4.7	-
<i>E.coli</i>	EMC+,A+	[1],[1]	0.0±0.0	1.00; 1.00
	EMC-,A+	[1/2],[1/4]	0.0±0.0	1.00; 1.00
	EMC+	[1/1]	0.0±0.0	-
	EMC-	[1/2]	0.0±0.0	-
	A+	[1/1]	0.0±0.0	-
	A-	[1/4]	0.0±0.0	-

Keterangan : EMC+ = Ekstrak metanolik daun *C.sinensis* dosis tinggi; EMC- = Ekstrak metanolik daun *C.sinensis* dosis rendah; A+ = Amoksisilin dosis tinggi; A- = Amoksisilin dosis rendah.

Tabel 4. Tampak bahwa kombinasi EMCA mampu menghasilkan ZOI pada *S.aureus* namun tidak membentuk ZOI pada *E.coli*.

Tabel 5. Jenis interaksi ZOI Kombinasi Ekstrak Metanolik Daun *C. sinensis*; Amoksisilin pada *S. aureus* dan *E. coli*

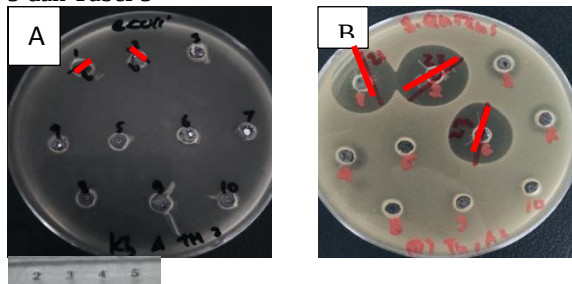
Bakteri	Kombinasi	Jenis Interaksi
<i>S. aureus</i>	EMC+,A+	Antagonis
	EMC-,A+	#Not distinguishable
	EMC+,A-	#Not distinguishable
	EMC-,A-	Sinergis
<i>E. coli</i>	EMC+,A+	#Not distinguishable
	EMC+,A-	#Not distinguishable

Keterangan : Syn. : Kombinasi meningkatkan efek antibakteri, Ant. : Kombinasi menurunkan efek antibakteri, Add. = Kombinasi tidak mempengaruhi efek antibakteri, * : ZOI kombinasi berbeda signifikan, # : ZOI kombinasi tidak berbeda signifikan.

Tabel 5. Interaksi kombinasi *C.sinensis* dengan amoksisilin terhadap *S.aureus* menunjukkan hasil antagonis pada EMC+A+, kombinasi EMC-A+ dan EMC+A- tidak berbeda signifikan dengan tunggalnya, serta EMC-A- menunjukkan hasil sinergis. Kombinasi EMC+A+ dan EMC+A- pada *E. coli* menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan dengan tunggalnya (not distinguishable)

ZOI Kombinasi Amoksisilin dengan Dekokta Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

Hasil ZOI kombinasi Dekokta daun *C.sinensis* dengan Amoksisilin (DCA) ditunjukkan pada Gambar 5 dan Tabel 5



Gambar 5. Hasil Zona Hambat Dekokta Daun Teh hijau Tunggal terhadap *E.coli* (A) dan *S.aureus* (B)

Tabel 6. Rerata (3x Ulangan) Pengukuran ZOI Kombinasi dekokta daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan Amoksisilin terhadap *E.coli* dan *S.aureus*

Bakteri	Kelompok kombinasi	Dilusi [DC], [A]	Rata-rata ZOI $\pm$ SD (mm)	Nilai Sig
<i>S. aureus</i>	DC+,A+	[1],[1]	21.6 $\pm$ 1.1	0.23; 0.03
	DC-,A+	[1/2],[1]	21.6 $\pm$ 1.1	0.34; 0.03
	DC+,A-	[1],[1/64]	0.0 $\pm$ 0.0	1.00; 1.00

<i>S. aureus</i>	DC-,A-	[1/2],[1/64]	0.0 $\pm$ 0.0	1.00; 1.00
	DC+	[1/1]	0.0 $\pm$ 0.0	-
	DC-	[1/2]	0.0 $\pm$ 0.0	-
	A+	[1/1]	22.7 $\pm$ 0.6	-
	A-	[1/64]	0.0 $\pm$ 0.0	-
<i>E. coli</i>	DC+,A+	[1],[1]	2.6 $\pm$ 4.6	0.79; 0.31
	DC-,A+	[1/2],[1]	8.6 $\pm$ 0.5	0.23; 0.34
	DC+,A-	[1],[1/4]	0.0 $\pm$ 0.0	1.00; 1.00
	DC-,A-	[1/2],[1/4]	0.0 $\pm$ 0.0	1.00; 1.00
	DC+	[1/1]	0.0 $\pm$ 0.0	-
	DC-	[1/2]	0.0 $\pm$ 0.0	-
	A+	[1/1]	3.0 $\pm$ 5.1	-
	A-	[1/4]	0.0 $\pm$ 0.0	-

Keterangan : DC+ = Dekokta daun *C.sinensis* dosis tinggi; DC- = Dekokta daun *C.sinensis* dosis rendah; A+ = Amoksisilin dosis tinggi; A- = Amoksisilin dosis rendah.

Tabel 6. menunjukkan bahwa kombinasi DCA mampu menghasilkan ZOI pada *S.aureus* 21,6mm begitu juga pada *E.coli* 2,6mm, namun lebih kuat menghambat pada *S.aureus*. Zona hambat dari kombinasi DCA pada *S.aureus* maupun *E.coli* hanya terdapat pada DC+A+ dan DC-A+.

Tabel 7. Jenis interaksi ZOI Kombinasi Dekokta Daun *C. sinensis*; Amoksisilin pada *S. aureus* dan *E. coli*

Bakteri	Kelompok Kombinasi	Jenis Interaksi
<i>S. aureus</i>	DC+,A+	Antagonis
	DC-,A+	Antagonis
	DC+,A-	#Not distinguishable
	DC-,A-	#Not distinguishable
<i>E. coli</i>	DC+,A+	Antagonis
	DC-,A+	Potensiasi
	DC+,A-	#Not distinguishable
	DC-,A-	#Not distinguishable

Keterangan : Syn. : Kombinasi meningkatkan efek antibakteri, Ant. : Kombinasi menurunkan efek antibakteri, Add. = Kombinasi tidak mempengaruhi efek antibakteri, * : ZOI kombinasi berbeda signifikan, # : ZOI kombinasi tidak berbeda signifikan.

Tabel 7. Interaksi kombinasi dekokta *C.sinensis* dengan amoksisilin terhadap *S.aureus* pada DC+A+ dan DC-A+ menunjukkan interaksi antagonis, namun pada DC+A- dan DC-A- menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan dengan tunggalnya. Interaksi kombinasi dekokta *C.sinensis* dengan amoksisilin terhadap *E.coli* pada DC+A+ menunjukkan hasil antagonis, DC-A+ menunjukkan hasil potensiasi dan pada DC+A- dan DC-A- memberikan hasil yang tidak berbeda signifikan dengan tunggalnya.

PEMBAHASAN

Daya Hambat Amoksisilin terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa amoksisilin lebih efektif menghambat pertumbuhan *S.aureus* dibanding *E.coli*. Hal tersebut dapat disebabkan karena *E.coli* memiliki dinding sel yang lebih kompleks yaitu dengan selapis sel peptidoglikan dan outer membrane (lipopolisakarida dan lipoprotein) dimana outer membrane ini memiliki mekanisme proteksi terhadap antibiotik dengan cara mencegah penetrasi antibiotik, selain itu tekanan osmotik *E.coli* lebih kecil sehingga lebih sulit mengalami lisis dibanding *S.aureus*²², sehingga amoksisilin kurang efektif dalam menghambat *E.coli*. Kriteria dari *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) amoksisilin dikatakan resisten jika menghasilkan diameter ZOI ≤ 13 mm, intermediet 14-16 mm, dan sensitif ≥ 17 mm²³.

Diameter ZOI *E.coli* yang terbentuk pada penelitian ini sangat lemah dan tergolong resisten. Dalam hal ini peneliti menduga beberapa faktor penyebab adanya bias, meliputi teknik pembuatan dan pengenceran larutan amoksisilin, serta bakteri *E.coli* yang digunakan. Pada pembuatan larutan Amoksisilin seharusnya digunakan dapar untuk pengenceran akhir²⁴. Pada penelitian ini hanya digunakan akuades steril sebagai pengencer tanpa menghitung pH dari akuades terlebih dahulu sehingga tidak dilakukan penghitungan terhadap pH akuades yang digunakan. Pemilihan pH dianggap penting karena dapat mempengaruhi kelarutan dan laju disolusi obat atau kecepatan efek yang diberikan obat terhadap target sehingga dapat mempengaruhi hasil uji ZOI tunggal maupun kombinasi. Faktor penyebab bias berikutnya adalah bakteri *E.coli* yang digunakan juga dapat mempengaruhi hasil penelitian²⁵.

Kalanjati (2012) melaporkan bahwa terdapat perbedaan sensitivitas amoksisilin pada strain *E.coli* terstandarisasi (*American Type Culture Collection/ATCC*) dengan strain *E.coli* lokal. Hal itu terjadi karena *E.coli* ATCC dikultur ulang tanpa pengaruh lingkungan yang berarti, sedangkan strain *E.coli* lokal/isolat klinis sebagaimana yang digunakan pada penelitian ini telah banyak mendapat pengaruh dari lingkungan yang dinamis sehingga timbul mekanisme pertahanan diri dengan mutasi gen yang mengakibatkan resistensi terhadap pemberian amoksisilin²⁶. Resistensi *E. coli* terhadap amoksisilin dan ampicilin disebabkan karena adanya kemampuan bakteri menghasilkan enzim β -laktamase yang disandi oleh gen dalam plasmid faktor R. Resistensi *E. coli* terhadap amoksisilin dapat dikatakan sebagai resistensi silang. Resistensi silang merupakan suatu keadaan resistensi bakteri terhadap antibiotik tertentu yang juga menunjukkan adanya sifat resistensi terhadap antibiotik lain. Resistensi silang yang terjadi antara ampicilin dan amoksisilin disebabkan karena kedua antibiotik tersebut memiliki mekanisme kerja yang sama, meskipun struktur kimianya berbeda²⁷.

Daya Hambat Ekstrak Metanolik Daun *C.sinensis* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanolik *C.sinensis* lebih efektif menghambat pertumbuhan *S.aureus* dibanding *E.coli*. Hal tersebut dapat disebabkan karena *E.coli* memiliki dinding sel yang lebih kompleks yaitu dengan selapis sel peptidoglikan dan outer membrane (lipopolisakarida dan lipoprotein) dimana outer membrane ini memiliki mekanisme proteksi terhadap antibiotik dengan cara mencegah penetrasi antibiotik selain itu tekanan osmotik *E.coli* lebih kecil sehingga lebih sulit mengalami lisis dibanding *S.aureus*, sehingga ekstrak daun *C.sinensis* kurang efektif dalam menghambat *E.coli*²².

Salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil ZOI yaitu adanya faktor bias pada penelitian ini. Pada penelitian ini yang menjadi faktor bias seperti, pemilihan pelarut yang tidak tepat untuk herbal daun *C.sinensis*. Larutan yang dipakai pada penelitian ini adalah metanol sedangkan pada penelitian sebelumnya adalah etanol (Michael,2012; Zeniusa,2018; Hardianto dan Delima,2018; Aininah,2018)^{28,29,30,31}. Prajnalaga dan Susilowati (2014) menemukan bahwa etanol lebih efektif menarik flavonoid dibandingkan metanol³². Perva-Uzunalić, *et al.*, (2006) dalam penelitiannya melakukan pengukuran kadar katekin daun *C.sinensis* yang diekstraksi menggunakan berbagai jenis pelarut membuktikan bahwa ekstrak daun *C.sinensis* dengan pelarut etanol mengandung senyawa katekin paling tinggi³³.

Hasil ZOI penelitian ini menunjukkan zona hambat lebih besar pada konsentrasi yang lebih tinggi. Hal tersebut sesuai dengan teori bahwa semakin tinggi konsentrasi, jumlah senyawa antibakteri ekstrak yang dilepaskan semakin besar, sehingga memudahkan penetrasi senyawa aktif tersebut ke dalam sel bakteri³⁴.

Hasil penelitian ini didapatkan Ekstrak Metanolik daun *C.sinensis* (EMC) memiliki daya hambat terhadap *S.aureus* maupun *E.coli* namun tidak sebesar dengan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (Michael,2012; Zeniusa,2018; Hardianto dan Delima,2018; Aininah,2018)^{28,29,30,31}.

Daya Hambat Dekokta Daun *C.sinensis* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Penelitian efek antibakteri dekokta daun *C.sinensis* (DC) terhadap *S.aureus* dan *E.coli* belum pernah dilakukan sebelumnya. Penelitian ini, didapatkan hasil Dekokta daun *C.sinensis* tidak mampu menghambat pertumbuhan *S.aureus* maupun *E.coli*. Hal tersebut diduga karena berkurang atau hilangnya senyawa antibakteri yang terkandung di dalam daun *C.sinensis* berupa flavonoid, saponin serta beberapa senyawa alkaloid yang memiliki sifat tidak tahan terhadap panas³⁵. Suhu yang tinggi dan waktu ekstraksi yang lama dapat menyebabkan epimerisasi,

oksidasi dan degradasi senyawa aktif daun *C.sinensis*, terutama katekin³³.

Masa inkubasi juga mempengaruhi daya hambat dekokta. Hal ini sesuai dengan penelitian Pratama *et al.*, (2016) yang menyimpulkan bahwa semakin lama waktu inkubasi maka semakin menurunkan aktivitas dekokta dalam menghambat pertumbuhan bakteri³⁶. Penelitian ini hanya digunakan dekokta daun *C.sinensis* 10%. Hal ini menyebabkan tidak munculnya daya hambat dekokta daun *C.sinensis* terhadap *S.aureus* dan *E.coli* dikarenakan rendahnya konsentrasi dekokta daun *C.sinensis*^{36,37}. Hardiningtyas (2009) meskipun air memiliki tingkat kepolaran yang tinggi, namun air jarang digunakan sebagai pelarut ekstraksi karena mempunyai beberapa kelemahan seperti menyebabkan reaksi fermentatif (mengakibatkan kerusakan bahan aktif lebih cepat), pembengkakan sel serta mudah terkontaminasi jamur maupun bakteri, sehingga dapat menurunkan efektivitas kinerja zat aktif herbal³⁸.

Daya Hambat Kombinasi Dekokta Daun *C.sinensis* dengan Amoksisilin terhadap *S.aureus* atau *E.coli*

Kombinasi dekokta daun *C.sinensis* dengan Amoksisilin (DCA) pada *S.aureus* menunjukkan hasil antagonis pada kombinasi DC+A+ dan DC-A+ dan pada *E.coli* menunjukkan hasil antagonis pada kombinasi DC+A+ saja. Sifat antagonis tersebut dapat terjadi karena adanya interaksi yang saling melemahkan atau mengganggu antara amoksisilin dengan ekstrak metanolik maupun dekokta daun *C.sinensis*. Katekin tidak mampu merusak dinding sel *E.coli* maupun *S.aureus*²². Hal ini juga sesuai dengan penelitian Stefanović (2018) yang juga menyatakan bahwa kombinasi herbal yang memiliki aktivitas antibakteri dapat bersifat sinergis bila dikombinasi dengan antibiotik konsentrasi rendah sehingga dapat menjadi pendekatan untuk mengurangi dosis efektif antibiotik, dan mengurangi efek samping antibiotik³⁹.

Kombinasi DC-A+ bersifat potensiasi pada *E.coli*. Hal ini dapat disebabkan karena adanya interaksi menguatkan antara amoksisilin dengan ekstrak dekokta daun *C.sinensis* sehingga menyebabkan peningkatan daya hambat bakteri yang signifikan. Katekin merupakan senyawa daun *C.sinensis* dengan kadar terbesar dan paling berpotensi sebagai antibakteri²⁹. Katekin bekerja dengan cara merusak dinding sel dan membran sitoplasma bakteri, sehingga mempermudah amoksisilin untuk bekerja menghambat pembentukan dinding sel bakteri, namun kombinasi DC+A- dan DC-A- pada *S.aureus* dan *E.coli* menunjukkan interaksi yang bersifat *not distinguishable* (tidak berbeda signifikan dengan tunggalnya), karena setelah dilakukan kombinasi tidak terdapat peningkatan diameter ZOI yang signifikan dibanding ZOI pemberian tunggal dekokta daun *C.sinensis* yang semula tidak memiliki daya hambat (diameter ZOI = 0 mm) begitu juga pada pemberian tunggal amoksisilin⁴⁰.

Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Metanolik Daun *C.sinensis* dengan Amoksisilin terhadap *S.aureus* atau *E.coli*

Kombinasi ekstrak metanolik *C.sinensis* pada *E.coli* (EMC+A+ dan EMC+A-) serta pada *S.aureus* (EMC-A+ dan EMC+A-) menunjukkan interaksi yang bersifat *not distinguishable* (tidak berbeda signifikan dengan tunggalnya), karena setelah dilakukan kombinasi tidak terdapat peningkatan diameter ZOI yang signifikan dibanding ZOI pemberian tunggal dekokta daun *C.sinensis* yang semula tidak memiliki daya hambat (diameter ZOI = 0 mm) begitu juga pada pemberian tunggal amoksisilin. Hal tersebut dapat terjadi karena tidak adanya interaksi yang saling menguatkan atau mengganggu antara amoksisilin dengan ekstrak metanolik maupun dekokta daun *C.sinensis*. Menurut Kalanjati (2012) melaporkan bahwa terdapat perbedaan sensitivitas amoksisilin pada strain *E.coli* terstandarisasi (*American Type Culture Collection/ ATCC*) dengan strain *E.coli* lokal. Hal itu terjadi karena *E.coli* ATCC dikultur ulang tanpa pengaruh lingkungan yang berarti, sedangkan strain *E.coli* lokal/ isolat klinis sebagaimana yang digunakan pada penelitian ini telah banyak mendapat pengaruh dari lingkungan yang dinamis sehingga timbul mekanisme pertahanan diri dengan mutasi gen terhadap pemberian amoksisilin²⁶.

Mekanisme pertahanan diri bakteri terhadap pemberian amoksisilin dapat disebabkan oleh empat mekanisme yaitu : (1) β -laktamase yang menginaktivasi antibiotik, (2) modifikasi dari PBP, (3) obat mengalami gangguan penetrasi pada PBP dan (4) efluks. Dari keempat mekanisme resistensi Amoksisilin, mekanisme yang sering terjadi adalah β -laktamase yang menginaktivasi antibiotik. Enzim ini sebaian besar dapat dihasilkan oleh *S. aureus*, *H. influenza*, dan *E. Coli*^{27,41}, oleh karena mekanisme pertahanan diri oleh bakteri inilah yang kemungkinan besar menyebabkan aktivitas antibakteri dari senyawa aktif ekstrak metanol maupun dekokta daun *C.sinensis* menjadi tidak efektif. Daun *C.sinensis* mengandung banyak senyawa metabolit primer maupun sekunder, beberapa diantaranya tidak berpotensi sebagai antibakteri. Sehingga, diduga bahwa keberagaman kandungan daun *C.sinensis* tersebut menyebabkan amoksisilin menjadi kurang efektif atau lebih sulit bekerja pada *E.coli* maupun *S. aureus*⁴³.

Kombinasi EMCA (EMC+A+) pada *S. aureus* bersifat antagonis karena kedua kombinasi menyebabkan penurunan diameter ZOI yang terbentuk secara signifikan dibanding pemberian tunggal amoksisilin. Sifat antagonis tersebut dapat terjadi karena adanya interaksi yang saling melemahkan atau mengganggu antara amoksisilin dengan ekstrak metanolik maupun dekokta daun *C.sinensis*. Kombinasi EMCA (EMC-A-) pada *S.aureus* bersifat sinergis. Efek sinergistik dapat ditimbulkan oleh adanya *efflux pump inhibitor* (EPI) dari senyawa aktif tanaman yang merupakan mekanisme resistensi

bakteri. EPI bekerja dengan menghambat *efflux pump* sehingga menyebabkan peningkatan konsentrasi antibiotik di dalam sel bakteri. Konsentrasi amoksisilin akan meningkat ketika terjadi hambatan *efflux pump* oleh senyawa katekin daun *C.sinensis* sehingga dapat meningkatkan aktivitas antibakteri amoksisilin⁴⁴.

Stefanović (2018) menyatakan bahwa kombinasi herbal yang memiliki aktivitas antibakteri dapat bersifat sinergis bila dikombinasi dengan antibiotik konsentrasi rendah sehingga dapat menjadi pendekatan untuk mengurangi dosis efektif antibiotik, dan mengurangi efek samping antibiotik³⁹.

Hal diatas bisa menunjang pengobatan amoksisilin dengan kombinasi *C.sinensis* menggunakan dosis rendah yang memiliki keefektifan yang hampir sama dengan penggunaan amoksisilin tunggal. Penggunaan tanaman herbal tidak dapat menjadi terapi utama melainkan sebagai terapi tambahan dalam mengatasi suatu penyakit karena aktivitas kerja herbal yang lama dan tidak spesifik, sehingga diharapkan dapat meningkatkan efek dari antibiotik dan memperkecil angka resistensi⁴⁵.

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisa data dan pembahasan penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak metanolik daun *Camellia sinensis* lebih efektif terhadap *S.aureus* dibandingkan dengan *E.coli* dan dekokta daun *Camellia sinensis* tidak memiliki daya hambat terhadap *S.aureus* maupun *E.coli*
2. Pada *S.aureus* kombinasi ekstrak metanolik daun *C.sinensis* dengan amoksisilin memiliki sifat antagonis (EMC+A-), bersifat *not distinguishable* (EMC-A+ dan EMC+A-) serta bersifat sinergis (EMC-A-), sedangkan kombinasi dekokta daun *C.sinensis* dengan amoksisilin bersifat antagonis (DC+A- dan DC-A+) dan bersifat *not distinguishable* (DC+A- dan DC-A-). Namun kedua kombinasi tidak memberikan efek yang lebih baik daripada penggunaan amoksisilin tunggal dosis tinggi
3. Pada *E.coli* kombinasi ekstrak metanolik daun *C.sinensis* dengan amoksisilin menunjukkan tidak ada zona hambat namun kombinasi dekokta daun *C.sinensis* dengan amoksisilin bersifat *not distinguishable* (DC+A- dan DC-A-), bersifat Antagonis (DC+A+), dan bersifat potensiasi (DC-A+).

Saran

Adapun beberapa saran untuk meningkatkan penelitian ini di masa mendatang antara lain :

1. Melakukan penelitian lanjutan uji fitokimia untuk mengetahui perbedaan jenis dan kadar senyawa antibakteri pada ekstrak metanolik dan dekokta daun *C.sinensis*

2. Melakukan penelitian lanjutan dengan menghilangkan faktor bias
3. Melakukan penelitian lanjutan fraksinasi senyawa aktif daun *C.sinensis* . Dilanjutkan identifikasi interaksi yang dihasilkan serta efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan *S.aureus* ketika dikombinasikan dengan antibiotik

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) selaku yang memberikan dana penelitian, serta kelompok penelitian yang telah membantu dalam berjalannya penelitian.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization (WHO). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. WHO Document Production Services. Geneva, Switzerland. 2015.
2. Sasongko, H. Uji Resistensi Bakteri *Escherichia Coli* dari Sungai Boyong Kabupaten Sleman terhadap Antibiotik Amoksisilin, Kloramfenikol, Sulfametoksazol, dan Streptomisin. *Jurnal Bioedukatika*. 2014. 2 : p. 25-29.
3. Setiawati, A. Peningkatan Resistensi Kultur Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap Amoxicillin Menggunakan Metode Adaptif Gradual. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2015. 7 : p. 190-194
4. Cabrera, C., Artacho, R. & Gimenez, R. Beneficial effects of green tea-A review. *Journal of The American College of Nutrition*. 2006. 25 : p. 79-99.
5. Pujar, M., Patil, C., Kaam, A. Comparison of Antimicrobial Efficacy of Triphala, (GTP) Green Tea Polyphenols and 3% of Sodium Hypochlorite on *Enterococcus Faecalis* biofilms Formed on Tooth Substrate in vitro. *Int Oral Health J*. 2011. 3 : p. 24-29
6. Aininah, Nur. Efek Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) dalam Memodulasi Aktivitas Amoksisilin Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. [Skripsi]. Makassar : Universitas Hasanuddin. 2018.
7. Amelia, R., Sudomo, P., dan Widasari, L. Perbandingan uji efektivitas ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis*) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara in vitro. *Bina widya*. 2012. 23: p. 177-182
8. Robinson, Trevor. Kandungan Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi, diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinat. Bandung: penerbit ITB. 1995
9. Lenny, S. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida (Makalah). Fakultas Matematika dan Ilmu Alam. Universitas Sumatera Utara. 2006

10. Harborne, J. B. Metode Fitokimia. Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. Terjemahan Kosasih Patmawinata dan Iwang Soediro. Edisi ke 3. Bandung. Penerbit ITB. 2006
11. Irwanto. Ekstraksi Menggunakan Proses Infudasi, Maserasi dan Perkolasi. Jakarta. 2010.
12. Meloan, CE. Chemical Separation Principles Techniques and Experiments Techniques in Analytical Chemistry. New York : J. Willey. 1999.
13. Kusumaningrum, A., Widiyaningrum, P., Mubarak, I.\. Penurunan Total Bakteri Daging Ayam dengan Perlakuan Perendaman Infusa Daun Salam (*Syzygium polyanthum*). *Jurnal MIPA*. 2013. 36: p. 14-19.
14. Fauziansyah, R.M., Risandiansyah, R., Yahya, A. Efek Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Sirih (*Piper betle* L.) dengan Antibiotik Amoxicillin, Chloramphenicol dan Cotrimoxazole terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *S.aureus* dan *E.coli* [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. 2018.
15. Risandiansyah, Rio. Induction of Secondary Metabolism Across Actinobacterial Genera [Tesis]. Department of Medical Biotechnology Faculty of Medicine, Nursing and Health Sciences Flinders University, South Australia. 2016.
16. Pratiwi, S. T. Mikrobiologi Farmasi. Erlangga. Jakarta. 2008.
17. Balouiri M., Sadiki M., Ibnsounda S.K., Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal Elsevier*. 2016. 6(2):71-9.
18. Sudirman, T. A. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. 2014.
19. Yunensa, Khorina Sari. Pengaruh Kombinasi Antibiotik Ampisilin dan Minyak Atsiri Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni*) terhadap *Staphylococcus aureus* Multiresisten [Skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2018
20. Davis, W. W., Stout, T. R. Disk plate method of microbiological antibiotic assay. *American Society for Microbiology*. 1971. 4(22).
21. [Ziaei-Daroukalei, N., Ameri, M., Zahraei-Salehi, T., Ziaei-Daroukalei, O., Mohajer-Tabrizi, T., Lotfollah Borneai.](#) AZDAST the New Horizon in Antimicrobial Synergism Detection. *MethodsX*. 2016. 3:43-52.
22. Amelia R., Sudomo P., Widasari, Lucy. Perbandingan Uji Efektivitas Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*. Fakultas Kedokteran UPN “Veteran”, Jakarta. 2011
23. [CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement*. West Valley (US): Clinical and Laboratory Standards Institute.
24. Harvey RA , Mycek MJ, Champe PC. *Farmakologi Ulasan Bergambar*. Jakarta: Widya Medika. Hal 407-415. 2009
25. Dirjen POM. Farmakope Indonesia Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 1995.
26. Kalanjati, Wulandari, W. Keberadaan *Escherichia coli* penghasil *extended spectrum β -lactamase* di lingkungan sentra pemotongan ayam pondok rumput kota Bogor. (Skripsi). Bogor: Fakultas Pertanian Bogor. 2017
27. Krisnaningsih MMF, Asmara W, Wibowo MH. Uji sensitivitas isolat *Escherichia coli* patogen pada ayam terhadap beberapa jenis antibiotik. *Jurnal Sain Veteriner*. 2005. 23(1):13-18.
28. Michael. Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) yang Diperoleh dengan Metode Soxhletasi terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro* [SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara Medan. 2012.
29. Zeniusa Popi, Ramadhian M. Risky. Efektivitas Ekstrak Etanol Teh Hijau dalam Menghambat Pertumbuhan *Escherichia coli* [SKRIPSI]. Bandar Lampung. Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. 2017.
30. Hardianto T.W.D., Delima E. Rosa. Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha Bandung. 2018
31. Ainiah, Nur. Efek Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) dalam Memodulasi Aktivitas Amoksisilin terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Makassar: Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. 2018.
32. Prajnalaga, F.C., Susilowati, Endang. Perbandingan Ekstrak Etanol dan Metanol Dauh Gaharu (*Aquilaria malaccensis*) terhadap Aktivitas Antiradikal Bebas dengan Metode DPPH [SKRIPSI]. Akademi Analisis Farmasi dan Makanan Putra Indonesia Malang. 2014
33. Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich B., Otto, F., Grüner Sabine. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency

- of major catechins and caffeine. *Food Chemistry, Elsevier*. 2006. **96**:597-605.
34. Brooks G.F., Butel S.J., Morse, Stephan A. Mikrobiologi Kedokteran. Ed. 23. EGC. Jakarta. 2008.
 35. Kiswandono, Agung Abadi. Skrining Senyawa Kimia dan Pengaruh Metode Maserasi dan Refluks pada Biji Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) terhadap Rendemen Ekstrak yang dihasilkan. Universitas Prima Indonesia (UNPRI), Medan. 2011.
 36. Pratama, M.A.M., Airlangga, H., Arfarita Novi. Aktivitas Hambatan Dekokta Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap Bakteri Oportunistik Penyebab Diare: *Escherichia coli* dan *Salmonella spp* secara in vitro. *Jurnal Bio Complementer Medicine*. 2016. **3**(1).
 37. Annita, Panus Hendri. Daya Hambat Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Kesehatan Saintika Meditory*. 2018. **1**(1)
 38. Hardiningtyas, S.D. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sarcophyton sp* yang difragmentasi dan Tidak difragmentasi di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu [SKRIPSI]. Bogor : Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. 2009.
 39. Saraswati, A. Efektivitas ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan NaOCL 2,5% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* sebagai alternatif larutan irigasi saluran akar [Skripsi]. Makassar: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin. 2015
 40. Thakur P, Chawla R, Goel R, Narula A, Arora R, Sharma RK. Augmenting the potency of third-line antibiotics with *Berberis aristata*: *In vitro* synergistic activity against carbapenem- resistant *Escherichia coli*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016. **6**: p. 10-16.
 41. Li, X-Z. & Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update, *Drugs*. 1555–1623. 2009.
 42. Ciuman, Raphael Richard. Phytotherapeutic and Naturopathic Adjuvant Therapies in Otorhinolaryngology. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012. **269**:389-397.
 43. Palczar, J.M dan Chan, E.C.S. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi 2. Jakarta: Penerbit UI Press.
 44. Katzung, Bertram G. Farmakologi Dasar dan Klinik, Ed. 12, Vol.2. Jakarta : EGC. 2012
 45. Ciuman, Raphael Richard. Phytotherapeutic and Naturopathic Adjuvant Therapies in Otorhinolaryngology. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012. **269**:389-397.