

UJI AKTIVITAS ANTI BAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN CENGKEH (*Syzygium aromaticum* L.) TERHADAP PERTUMBUHAN *Escherichia coli* SECARA IN-VITRO

Kandida Bibiana Ugha, Desi Indria Rini, S.M.J Koamesah

ABSTRAK

Escherichia coli adalah bakteri gram-negatif yang merupakan flora komensal di saluran usus besar manusia yang sering menyebabkan infeksi traktus urinarius, infeksi gastrointestinal, saluran empedu dan traktus respiratorius bawah. Hal ini masih menjadi masalah yang penting, mengingat banyaknya kasus yang dilaporkan. Cengkeh merupakan tanaman yang dapat dijumpai di daerah Nusa Tenggara Timur dan telah dilakukan penelitian bahwa daun cengkeh memiliki senyawa aktif berupa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin yang dapat berfungsi sebagai antibakteri. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *in-vitro*. Metode Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experiment* dengan rancangan penelitian *posttest only control group*. Metode yang digunakan ialah metode difusi dengan kertas cakram, menggunakan konsentrasi ekstrak uji yaitu 100%, 80%, 60%, 40% 20%, 10% dan kontrol positif streptomisin injeksi dan kontrol negatif aquades steril, serta dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil dibaca setelah inkubasi selama 24 jam. Hasil penelitian ini Zona hambat terbentuk pada semua konsentrasi ekstrak. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan $p = 0,003$ yang berarti terdapat perbedaan signifikan diameter zona hambat antar dua kelompok atau lebih ($p < 0,05$). Dari penelitian ini disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun cengkeh memiliki kemampuan antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Zona hambat terbesar dibentuk pada konsentrasi 100% sebesar 1,58 cm dan zona hambat terkecil pada konsentrasi 10% sebesar 0,63 cm.

Kata kunci : daun cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.), *Escherichia coli*, antibakteri

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti bakteri, virus, parasit atau jamur⁽¹⁾. Berdasarkan Profil Kesehatan Indonesia tahun 2016, penyakit infeksi oleh bakteri merupakan kasus terbanyak keempat⁽²⁾. Di Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT) berdasarkan Profil Kesehatan Provinsi Nusa Tenggara Timur tahun 2016, dilaporkan penyakit infeksi masuk dalam urutan pertama dan ketujuh dalam pola 10 penyakit terbanyak di Puskesmas. Urutan pertama yakni Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA) dan urutan ketujuh yakni infeksi penyakit usus⁽³⁾.

Salah satu bakteri yang menjadi penyebab penyakit infeksi adalah *Escherichia coli*. *Escherichia coli* adalah bakteri gram-negatif yang merupakan flora

komensal di saluran usus besar manusia⁽⁴⁾. Bakteri ini berpotensi menyebabkan berbagai infeksi seperti infeksi traktus urinarius, infeksi gastrointestinal, saluran empedu dan traktus respiratorius bawah^(4,5).

Penggunaan antibiotik mulai dari golongan antibiotik konvensional sampai sintetis modern telah banyak dipakai untuk mengatasi kasus infeksi *Escherichia coli*. Walaupun bakteri ini dapat diobati dengan antibiotik, ternyata *Escherichia coli* sendiri umumnya resisten terhadap antibiotik lain seperti penisilin dan ampicilin⁽⁴⁾. Selain dampak resistensi antibiotik, penggunaan antibiotik juga dapat menimbulkan efek samping mencakup reaksi hematologik, reaksi alergi, reaksi saluran cerna, dan reaksi hematologik^(5,6).

Timbulnya berbagai penyakit infeksi oleh bakteri dan kejadian resistensi terhadap antibiotik mendorong peneliti untuk terus dilakukannya penelitian baru, bukan hanya menghasilkan antibiotik baru yang memiliki efikasi lebih optimal untuk mengobati penyakit infeksi, tetapi juga menemukan alternatif. Untuk meminimalisasi dampak negatif penggunaan antibiotik tersebut, dapat digunakan pengobatan alternatif yaitu dengan menggunakan obat herbal⁽⁷⁾.

Indonesia memiliki banyak tanaman yang dapat dijadikan obat herbal, salah satunya adalah tanaman cengkeh. Selain digunakan dalam industri makanan, minuman dan rokok kretek, cengkeh sudah sejak lama digunakan dalam pengobatan sehari - hari karena minyak cengkeh mempunyai efek farmakologi, salah satunya yaitu efek antibakteri⁽⁸⁾. Senyawa yang bersifat antibakteri dalam tanaman cengkeh yaitu flavonoid, tanin, triterpenoid serta senyawa eugenol⁽⁹⁾.

Dilihat dari komposisi zat kimianya, cengkeh memiliki kandungan zat eugenol, saponin, tanin, dan flavonoid. Senyawa tersebut memiliki efek farmakologis sebagai antiinflamasi, antioksidan, analgesik, fungisidal, dan bakterisidal. Eugenol sering digunakan dalam *dentistry* (ilmu kedokteran gigi) sebagai analgesik dan antiseptik. Saponin juga digunakan sebagai spermisida, antimikroba, anti peradangan, dan aktivitas sitotoksik terhadap dinding sel kulit. Flavonoid juga memiliki kegunaan terhadap manusia yaitu sebagai antibiotik dan menghambat perdarahan. Tanin juga telah terbukti sebagai antibakteri yang dapat menghindarkan luka dari infeksi oleh bakteri sehingga luka dapat cepat sembuh⁽¹⁰⁾.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experiment design* dengan rancangan penelitian *postest only control*

group design. Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Nusa Cendana pada bulan September-November 2018.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari Balai Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) Kupang. Penelitian ini menggunakan 10 kelompok, yaitu ekstrak etanol daun cengkeh konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, 20% , 10%, kontrol positif yaitu streptomisin injeksi, dan kontrol negatif yaitu aquades steril dengan 3 kali pengulangan berdasarkan rumus Federer.

Ekstraksi daun cengkeh

Daun cengkeh yang telah dipetik dan dikeringkan 4-5 hari, kemudian dihaluskan hingga diperoleh simplisia daun sebanyak 352,40 gram. Simplisia kemudian direndam selama 3 hari menggunakan alkohol 70% sebanyak 2.524 ml. Perbandingan perendaman 1:10 (1 gram simplisia : 10 ml alkohol). Setiap hari terus dilakukan pengadukan dan ditutup dengan *aluminium foil* dan tutup toples.

Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan, hingga diperoleh bagian cairnya sebanyak 400 ml. Setelah itu dilakukan evaporasi dengan suhu 46°C selama 20 jam.

Uji bebas etanol

Ekstrak kental yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji bebas etanol, dengan cara mencampurkan ekstrak etanol daun cengkeh, asam sulfat pekat dan asam asetat, kemudia dipanaskan dan dibau untuk mendeteksi ada tidaknya aroma ester. Uji ini dilakukan untuk membebaskan ekstrak dari etanol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa ada kontaminasi. Uji ini dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Nusa Cendana.

Analisis Fitokimia

Flavonoid

Ekstrak ekstrak etanol daun cengkeh sebanyak 1 mL diambil, lalu ditambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga

Saponin

Simplisia sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquades 10 ml, lalu dikocok. Tabung reaksi tersebut didiamkan dan diperhatikan ada atau tidak adanya busa. Sampel mengandung saponin jika terbentuk busa stabil dengan ketinggian 1-3.

Tanin

Uji polifenol/tanin dilakukan dengan melakukan penambahan FeCl_3 10% pada ekstrak daun cengkeh. Adanya senyawa ini dapat dilihat dengan perubahan warna menjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan. Perubahan warna dengan terjadi karena adanya gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin.

Alkaloid

Ekstrak etanol daun cengkeh sebanyak 2 ml diambil, lalu ditambahkan pereaksi Wagner sebanyak kurang lebih 2-3 tetes. Adanya alkaloid ditandai dengan adanya endapan coklat.

Pembuatan konsentrasi ekstrak

Ekstrak daun cengkeh diencerkan dengan aquades steril. Setelah itu dilakukan pembuatan berbagai konsentrasi ekstrak daun cengkeh sebesar 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, dan 10%, dilakukan pengenceran secara manual dengan aquades menggunakan rumus $M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$ dari hasil ekstrak daun cengkeh 100%.

Pembuatan NA (Nutrient Agar) dan media uji

Sebanyak 200 gram NA dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 1.000 ml. Agar tersebut kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai bahan larut. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfer selama 15 menit, ditunggu hingga dingin, kemudian hasil larutan dituang ke dalam cawan petri.

Inokulasi bakteri *Escherichia coli*

Proses inokulasi bakteri *Escherichia coli*, yaitu pertama mendinginkan selama beberapa saat media NA untuk menghilangkan uap air pada cawan petri. Kemudian mengambil satu ose *Escherichia coli* kemudian menginokulasi secara merata pada permukaan NA dengan teknik sinambung menggunakan kapas lidi dan didiamkan selama 10 menit.

Uji aktivitas antibakteri

Memasukkan kertas cakram atau mencelupkan ke dalam cawan petri dengan tiap konsentrasi ekstrak daun cengkeh, selama 10-15 menit. Sesudahnya, masukan kertas cakram tersebut dengan pinset steril ke dalam cawan petri yang telah terisi media NA dan bakteri *Escherichia coli* ditanam tepat ditengah-tengah media, kemudian menutup cawan petri, menginkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi tutup cawan petri terbalik.

Pengamatan

Tahap pengamatan penelitian, yaitu meletakkan cawan petri secara berurutan di atas meja sesuai dengan perlakuannya, kemudian meletakkan cawan petri secara terbalik agar tutup cawan petri tidak mudah terbuka dan mengukur diameter zona hambat yang muncul pada masing-masing perlakuan dengan menggunakan jangka sorong.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Daun Cengkeh

Daun cengkeh yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cengkeh yang berasal dari Desa Sawu, Kecamatan Mauponggo, Kabupaten Nagekeo, Provinsi Nusa Tenggara Timur. Daerah tersebut memiliki intensitas musim penghujan yang lama sekitar 7 bulan dan iklim yang lembab, sehingga cocok untuk ditumbuhi tanaman cengkeh.

Setelah dilakukan proses penguapan hingga pada tahap akhir, diperoleh ekstrak kental sebanyak 210 ml.

Uji bebas etanol

Hasil identifikasi pada Tabel. 1

Identifikasi	Prosedur	Hasil
Uji Bebas Etanol	Ekstrak + H ₂ SO ₄ + CH ₃ COOH → dipanaskan	Tidak tercium bau ester

Analisis Fitokimia

Hasil analisis fitokimia pada ekstrak etanol daun cengkeh yaitu untuk uji flavonoid, tanin dan alkaloid didapatkan hasil positif dengan intensitas kuat (+++), sedangkan saponin terdeteksi positif dengan intensitas sedang (++)

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ini dilakukan menggunakan metode difusi kertas cakram, dengan konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40%, 20%, dan 10% ditambah kontrol positif dan kontrol negatif terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*. Pengukuran dilakukan menggunakan jangka sorong, dengan cara mengukur diameter zona hambat/zona bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram.

Hasil uji dapat dilihat pada Tabel. 2

Konsentrasi	Diameter zona hambat			
	P1	P2	P3	Rata-rata
100%	1,81cm	1,41cm	1,51cm	1,58cm
80%	1,24cm	1,50cm	1,40cm	1,38cm
60%	1,20cm	1,37cm	0,98cm	1,18cm
40%	1,22cm	1,10cm	0,84cm	1,05cm
20%	1,00cm	0,97cm	0,85cm	0,94cm
10%	0,45cm	0,72cm	0,72cm	0,63cm
K (+)	4,20cm	4,21cm	4,20cm	4,20cm
K (-)	0,00cm	0,00cm	0,00cm	0,00cm

Ket: P1 : perlakuan 1
 P2 : perlakuan 2
 P3 : perlakuan 3
 K+ : kontrol positif
 K- : kontrol negatif

Pada tabel 2 dapat dilihat bahwa konsentrasi ekstrak etanol daun cengkeh 10% menghasilkan diameter zona hambat sebesar 0,63 cm, konsentrasi 20% menghasilkan diameter 0,94 cm, konsentrasi 40% menghasilkan diameter 1,05 cm, konsentrasi 60% menghasilkan diameter 1,18 cm, konsentrasi 80% menghasilkan diameter 1,38 cm, dan konsentrasi 100% menghasilkan diameter 1,58 cm. Dengan demikian yang menghasilkan zona hambat terkecil yaitu konsentrasi 10% dan zona hambat terbesar yaitu 100%, sehingga dapat diketahui yang merupakan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yaitu konsentrasi 10% dan yang merupakan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah 100%.

Uji Signifikansi Diameter Zona Hambat

Uji ini menggunakan uji statistik *kruskal-wallis*, karena didapatkan data

tidak terdistribusi normal dengan nilai $p = 0,00$ ($p < 0,05$) dan data tidak homogen dengan nilai $p = 0,04 < 0,05$. Pada uji statistik *kruskal-wallis* diperoleh nilai p sebesar $0,003$ ($p < 0,05$), yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara minimal dua kelompok konsentrasi.

Uji Signifikansi Antar Kelompok

Uji ini dinamakan uji *post hoc* yaitu uji yang bertujuan untuk melihat lebih jelas kelompok mana yang memiliki signifikansi. Analisis ini menggunakan uji *Mann-Whitney* karena digunakan rata-rata sebagai analisis signifikansi, data tidak terdistribusi normal dan variabel yang digunakan merupakan variabel data kategorik dan variabel data interval.

Hasil dapat dilihat pada Tabel 3

Kelompok	100 %	80 %	60 %	40 %	20 %	10 %	K-	K+
100 %	-	-	-	-	-	+	+	+
80 %	-	-	-	-	-	+	+	+
60 %	-	-	-	-	-	+	+	+
40 %	-	+	-	-	-	+	+	+
20 %	-	+	-	-	-	+	+	+
10 %	+	+	+	+	+	-	-	+
K -	+	+	+	+	+	+	-	+
K +	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabel 3 menunjukkan hasil uji perbedaan diameter zona hambat dari berbagai konsentrasi ekstrak maupun kontrol yang menunjukkan bahwa ada kelompok-kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai probabilitas *Asymp.Sig (2-tailed) < 0,05* dan kelompok-kelompok yang tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai probabilitas *Asymp. Sig. (2-tailed) > 0,05*.

Daun yang dipetik merupakan daun tua atau daun yang berada pada deretan satu dan dua dari pangkal ranting. Setelah didapatkan ekstrak daun, dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak. Uji tersebut dilakukan dan mendapat hasil adanya kandungan senyawa aktif yaitu alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin yang

tertera pada tabel 1. Hasil ini sejalan dengan penelitian oleh Eskha M. Lambiju, dkk (2017) pada ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum L.*) yang mendapat identifikasi senyawa yaitu flavonoid, tanin, saponin, terpenoid dan fenol⁽⁹⁾.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi dengan kertas cakram. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cengkeh dilakukan dengan melihat adanya diameter zona hambat yang terbentuk disekeliling kertas cakram. Diameter zona hambat tersebut diukur dengan menggunakan alat ukur jangka sorong yang hasilnya tertera pada tabel 2. Hasil ini sejalan dengan penelitian oleh Shirly Kumala dan Dian Indriani (2008) tentang uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun cengkeh terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan hasil ekstrak memiliki daya hambat sebagai antibakteri. Namun, penelitian ini memiliki perbedaan pada ukuran diameter zona hambat. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan besar konsentrasi ekstrak yang digunakan⁽⁷⁾.

Berdasarkan hasil yang tertera pada tabel 2 didapatkan hasil bahwa diameter zona hambat yang terbentuk memiliki kenaikan seiring dengan kenaikan besar konsentrasi ekstrak etanol daun cengkeh. Hal ini sejalan dengan adanya kandungan senyawa aktif pada ekstrak. Semakin rendah konsentrasi ekstrak maka kandungan senyawa aktif juga rendah dan semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka senyawa aktif juga meningkat, sehingga mempengaruhi besar diameter zona hambat yang terbentuk⁽⁴³⁾.

Pada analisis fitokimia, didapatkan kandungan senyawa aktif yaitu flavonoid, tanin, alkaloid dan saponin. Senyawa-senyawa inilah yang berperan dalam proses penghambatan pertumbuhan *Escherichia coli*^(42,43).

Flavonoid berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, menonaktifkan kerja enzim, dan merusak membran sel. Cincin beta dan gugus -OH pada flavonoid diduga sebagai struktur yang bertanggungjawab sebagai aktivitas antibakteri^(23,42).

Tanin dapat menghambat pertumbuhan bakteri melalui struktur astrigen yang berikatan dengan enzim dan substrat bakteri. Tanin juga bekerja dengan merusak membran sel, Tanin dapat berikatan dengan besi dimana besi dibutuhkan bakteri untuk metabolismenya. Ketiadaan besi mengakibatkan kematian bakteri^(25,42).

Alkaloid bekerja sebagai antibakteri dengan cara berinteraksi dengan dinding sel yang berujung pada kerusakan dinding sel. Alkaloid juga dapat berikatan dengan DNA bakteri yang menyebabkan kegagalan sintesis protein^(42,44).

Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan cara meningkatkan permeabilitas membran sel. Struktur yang berperan sebagai antibakteri adalah aglikon yang masuk ke dalam lapisan lipid bilayer bakteri. Saponin juga dapat mengubah fungsi protein atau glikoprotein di membran sel dan membentuk ikatan dengan kolesterol untuk merusak struktur fosfolipid membran sel^(42,45).

Penelitian ini juga menggunakan kontrol sebagai pembanding yaitu kontrol positif yaitu streptomisin injeksi dan kontrol negatif yaitu aquades steril. Streptomisin merupakan antibiotik dari golongan aminoglikosid yang bekerja dengan menghambat sintesis protein atau bersifat *bakterisidal*, sehingga perlakuan kontrol positif ini menghasilkan diameter zona hambat paling besar dari semua perlakuan, sedangkan perlakuan menggunakan aquades steril tidak menghasilkan diameter zona hambat,

karena aquades steril bukan merupakan senyawa antibakteri^(28,46).

KESIMPULAN

1. Ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum l.*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*, dengan kecenderungan semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka zona hambat yang terbentuk semakin besar.
2. Ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum l.*) mengandung senyawa aktif flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin.
3. Konsentrasi paling kuat ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum l.*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah 100% dengan zona hambat sebesar 1,58 cm sebagai Kadar Bunuh Minimum (KBM) dan konsentrasi paling rendah adalah 10% dengan zona hambat sebesar 0,63 cm sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM).

SARAN

1. Perlu dilakukan uji kualitas dan kuantitas kandungan yang terdapat dalam ekstrak daun cengkeh sebagai antibakteri.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ekstrak daun cengkeh sebagai antibakteri dengan konsentrasi yang lebih bervariasi lagi, dengan range yang tidak terlalu jauh, sehingga didapatkan nilai konsentrasi hambat seminimal mungkin

DAFTAR PUSTAKA

1. K SM, Daldiyono. Diare Akut. In: Tim Editor, editor. Ilmu Penyakit Dalam. VI. Jakarta: InternaPublishing; 2015. p. 1901.
2. Kementrian Kesehatan. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013 [Internet]. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI. 2014. 507 p. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Profil+Data+Kesehatan+Indonesia+Tahun+2011#0>
3. Dinas Kesehatan Provinsi Nusa Tenggara Timur. Profil Kesehatan Provinsi NTT Tahun 2016. 2016;
4. Elliot T, Worthington T, Osman H, Gill M. Mikrobiologi Kedokteran dan Infeksi. 4th ed. New York: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2013.
5. Wibowo MH, Amani S. Efektivitas Pengobatan Preparat Kombinasi Amoksisilin dan Kolistin Sulfat pada Kasus Infeksi Buatan *Escherichia coli* Patogen pada Ayam Broiler. *J Sains Vet.* 2009;27(1):1–8.
6. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg. 23rd ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2008.
7. Kumala S, Indriani D. Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Cengkeh (*Eugenia Aromatic L.*). *J Farm Indones.* 2008;4(2):82.
8. Wahyuno D, Martini E. Pedoman Budi Daya Cengkeh di Kebun Campur. 2015;
9. Lambiju EM, Wowor PM, Leman MA. Uji daya hambat ekstrak daun cengkih (*Syzygium aromaticum (L.)*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. 2017;5:80.
10. Octavia N. Efek minyak atsiri daun cengkeh (*Syzygium aromaticum L.*) terhadap mortalitas larva *Anopheles aconitus*. Skripsi [Internet]. 2010; Available from: <https://eprints.uns.ac.id/8733/1/126760308201008051.pdf>
11. Welch RA. The Genus *Escherichia*. *Prokaryotes Prokaryotic Biol Symbiotic Assoc* [Internet]. 2006;60–71. Available from: <http://www.springer.com/life+science/microbiology/book/978-3-642-30193-3>
12. Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S, Keroudean M, et al. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol.* 2011;11(3):654–62.
13. Yingst SL, Saad MD, Felt SA. Classifying *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1297–9.
14. Andriani. *Escherichia Coli* 0157 H : 7 Sebagai Penyebab Penyakit Zoonosis. Lokakarya Penyakit Nas Zoonosis [Internet]. :173–7. Available from: <http://peternakan.litbang.pertanian.go.id/fullteks/lokakarya/lkzo05-28.pdf?secure=1>
15. Staf Pengajar FK UI. Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran Edisi Revisi. Staf Pengajar Bagian Mikrobiologi FK UI, editor. Jakarta: Binapura Aksara; 2002.
16. Ruhnayat A, Wahyudi A. Petunjuk Teknis Pembenihan Tanaman Cengkeh (*Eugenia aromaticum*). Pedoman Tek Budid Teknol Tanam Rempah dan Obat. 2012;1–34.
17. Kiptantiyawati N. Pertumbuhan Tanaman Cengkih (*Syzygium Aromaticum (L.) Merr And Perr*)

- Belum Menghasilkan Pada Berbagai Dosis Pupuk Organik Dan Konsentrasi Hydrasil. 2016;
18. Nurdjannah N. Diversifikasi Penggunaan Cengkeh. Perspektif [Internet]. 2016;3(2):61–70. Available from: <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/psp/article/view/5584>
 19. Cinthia Rosalina Aulia. Potensi Minyak Astiri. Skripsi. 2016;5–19.
 20. Towaha J. Manfaat Eugenol Cengkeh dalam Berbagai Industri Di Indonesia. Perspektif. 2012;11(2):79–90.
 21. Gershon RRM, Vlahov D, Felkner SA, Vesley D, Johnson PC, Delclos GL, et al. PDF Editor. Am J Infect Control. 1995;23(4):225–36.
 22. Noviansari R. Transformasi Metil Eugenol Menjadi Senyawa 3-(3,4-Dimetoksi Fenil)-1-Propanol dan Uji Aktivitasnya Sebagai Antibakteri Terhadap *Escherichia coli*. 2012.
 23. Fahrunnida, Pratiwi R. Kandungan Saponin Buah, Daun dan Tangkai Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Pendidik Biol Pendidik Geogr Pendidik Sains, PKLH – FKIP UNS [Internet]. 2009;220–4. Available from: <http://jurnal.fkip.uns.ac.id/index.php/kpsda/article/view/5378/3794>
 24. Rumagit Hm, Runtuwene Mrj, Sudewi S. Uji Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Spons *Lamellodysidea Herbacea*. J Ilm Farm - Unsrat. 2015;4(3):183–92.
 25. Fatimahtuzzahroh, Firani NK, Kritianto H. Efektifitas Ekstrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap Jumlah Pembuluh Darah Kapiler pada Proses Penyembuhan Luka Insisi Fase Proliferasi. Maj Kesehat FKUB. 2015;2.
 26. Simaremare ES. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). Pharmacy. 2014;11(01):98–107.
 27. Indriasih M, Chahaya I, Ashar. T. Pemanfaatan Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium Aromaticum*) Sebagai Repellent Nabati Dalam Mengurangi Jumlah Lalat Yang Hinggap Selama Proses Penjemuran Ikan Asin. Fak Kesehat Masyarakat, Univ Sumatera Utara Medan. 2013;1–10.
 28. Menkes Ri. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Peratur Menteri Kesehat No 2406 Tahun 2011 Tentang Pedoman Umum Pengguna Antibiot. 2011;4.
 29. Ganiswarna Sg, Setiabudy R, Suyatna Fd, Purwastyastuti, Nafriadi. Farmakologi Dan Terapi. 6th Ed. Jakarta: Gaya Baru; 2017.
 30. Mukhriani. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, Dan Identifikasi Senyawa Aktif. J Kesehat. 2014;VII(2):361–7.
 31. Istiqomah. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis Retrofracti Fructus*). Skripsi. 2013. 1-82 P.
 32. Arifianti L, Oktarina Rd, Kusumawati I. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi. E-Journal Planta Husada. 2014;2(1):3–6.
 33. Dr. Tedi Hudaya, St, Mengsc Susiana Prasetyo, St M, Anastasia Prima Kristijarti, Ssi M. Laporan Penelitian: Ekstraksi, Isolasi, Dan Uji Keaktifan Senyawa Aktif Buah Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa*) Sebagai Pengawet Makanan Alami Disusun. 2013;(November).

34. Harti As, Kusumawati Hn, Estuningsih. Perbandingan Uji Aktivitas Anti Bakteri Chitooligosakarida Terhadap *Escherichia Coli* Atcc 25922 , *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923 Dan *Salmonella Typhi* Secara In Vitro The Comparation Antibacterial Activity Of C Hitoooligosaccharide Against *Escherichia Col*.
35. Muharni, Fitrya, Oktaruliza M, Elfita. Antibacterial And Antioxidant Activity Testing Of Pyranon Derivated Compound From Endophytic Fungi *Penicillium Sp* Of Kunyit Putih (*Curcuma Zedoaria* (Berg) Roscoe). *Trad Med J*. 2014;19(3):107–12.
36. Syahdrajat T. Panduan Penelitian Untuk Skripsi Kedokteran dan Kesehatan. 2017.
37. Enander, Gagnon, Gute. Besar Sampel dan Teknik Sampling. 2011;97(5):1–11.
38. Rahmawati N, Sudjarwo E, Widodo E. Uji aktivitas antibakteri ekstrak herbal terhadap bakteri *Escherichia coli*. *J Ilmu-ilmu Peternak*. 2014;24(3):24–31.
39. Paramesti NN. Efektivitas Ekstrak Biji Pepaya (*Carica papaya L*) sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Escherichia coli*. 2014;51.
40. Anon. Nutrient agar. Neogen Corporation [Internet]. 2009;(July):2–3. Available from: http://www.neogen.com/Acumedial/pdf/ProdInfo/7145_PI.pdf
41. Nugroho Bunafit. Profil Kabupaten Nagekeo. 2013;1.
42. Muharni, Fitrya, Farida S. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Musi di Kabupaten Musi Banyuasin , Sumatera Selatan. *J Kefarmasian Indones*. 2017;7(2):127–35.
43. Febrina L, Riris ID, Silaban S. Uji aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan antioksidan dari ekstrak air tumbuhan binara (*Artemisia vulgaris L.*). *J Pendidik Kim* [Internet]. 2017;9(2):311–7. Available from: <http://jurnal.unimed.ac.id/2012/index.php/jpk/article/view/7621>
44. Nuryanto, Anjar , Luliana, Sri, Armyanti I. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera Foetida L.*) Terhadap *Escherichia Coli* Secara In Vitro. *Br J Psychiatry* [Internet]. 2014;205(01):76–7. Available From: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007125000277040/type/journal_article
45. Agni Rimba Mawan dan Sri Endah Indriwati S. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Buah *Syzygium polyanthum* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Bioeksperimen*. 2018;4(1):64–8.
46. Hammado N, Illing I. Identifikasi Senyawa Bahan Aktif Alkaloid Pada Tanaman Lahuna (*Eupatorium odoratum*). *J Din*. 2013;04(2):1–18.
47. Fahrunnida, Pratiwi R. Kandungan Saponin Buah , Daun dan Tangkai Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L .*). *Semin Nas Konserv dan Pemanfaat Sumber Daya Alam*. 2015;220–4.
48. Suryati N, Bahar E. Artikel Penelitian Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Aloe vera Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* Secara In Vitro . 2017;6(3):518–22.