

Efek Antibakteri Kombinasi Ekstrak Metanol atau Dekokta Daun *Annona muricata* L. dengan Kloramfenikol pada *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* secara *in vitro*

Sonia Agustin Ervina A., Reza Hakim*, Erna Sulistyowati
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Terapi antibiotik yang irasional dapat meningkatkan risiko resistensi antibiotik. Daun *A.muricata* L. mengandung zat antimikroba dengan cara merusak membran sel bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat kombinasi ekstrak metanolik atau dekokta daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol terhadap *S.aureus* atau *E.coli* untuk mengurangi resistensi antibiotik.

Metode: Uji Zona Inhibisi kloramfenikol tunggal, ekstrak metanol daun *A.muricata* L. tunggal, dekokta daun *A.muricata* L. tunggal, kombinasi ekstrak metanol daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol dan kombinasi dekokta daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol pada *S.aureus* dan *E.coli*. menggunakan metode *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST)* yang dimodifikasi dan analisa statistik dengan uji *Mann-Whitney* dengan tingkat signifikansi $p < 0.05$.

Hasil: Pada *S.aureus* kombinasi ekstrak metanol daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol dosis tinggi dan rendah menunjukkan peningkatan zona inhibisi berturut-turut ($30,0 \pm 1,0$ mm; $25,0 \pm 0,0$ mm), tetapi secara statistik tidak dapat dibedakan dari penggunaan tunggalnya. Sama halnya pada kombinasi dekokta *A.muricata* L. dengan kloramfenikol dosis tinggi dan rendah menunjukkan peningkatan zona inhibisi berturut-turut ($24,7 \pm 2,08$ mm; $26,3 \pm 2,08$ mm; $16,7 \pm 14,4$ mm; $13,7 \pm 11,8$ mm), tetapi secara statistik tidak dapat dibedakan dari penggunaan tunggalnya. Pada *E.coli* tidak menunjukkan peningkatan zona inhibisi pada kombinasi ekstrak metanol dan dekokta *A.muricata* L. dengan kloramfenikol dosis tinggi ($0,0 \pm 0,0$ mm) dan ($12,0 \pm 0,0$ mm; $11,7 \pm 1,1$ mm).

Kesimpulan: Kombinasi ekstrak metanol atau dekokta daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol tidak meningkatkan daya hambat terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

Kata Kunci: *A.muricata* L., Kloramfenikol, *S.aureus*, *E.coli*, resistensi antibiotik

*Korespondensi:

Reza Hakim, (0341) 578920

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

e-mail: rezahakim@unisma.ac.id

Antibacterial Combination Effect of Methanol Extract or Decoction *Annona muricata* L. Leaves With Chloramphenicol in *Staphylococcus aureus* and *Eschericia coli* *in vitro*

Sonia Agustin Ervina A., Reza Hakim*, Erna Sulistyowati
Medical Faculty University of Islamic Malang

ABSTRACT

Introduction: Irrational antibiotic therapy can increase the risk of antibiotic resistance. *A.muricata* L. leaves contain antimicrobial substances by damaging bacterial cell membranes. This study aims to determine the inhibition of the combination of methanolic extract or decoction of *A.muricata* L. leaves with chloramphenicol against *S.aureus* or *E.coli* to minimize antibiotic resistance.

Methods: Single chloramphenicol inhibition zone test, single *A.muricata* L. leaf methanol extract, *A.muricata* L. single leaf decoction, a combination of *A.muricata* L. leaf methanolic extract with chloramphenicol and a combination of *A.muricata* L. leaf decoction with chloramphenicol on *S. aureus* and *E. coli*. using the modified *Ameri-Ziaei Double Antibiotic Synergism Test (AZDAST)* method and statistical analysis using the *Mann-Whitney* test with a significance level of $p < 0.05$.

Results: On *S.aureus*, the combination of *A.muricata* L. leaf methanol extract with high and low doses of chloramphenicol showed an increase in the zone of inhibition respectively (30.0 ± 1.0 mm; 25.0 ± 0.0 mm), but it was not statistically indistinguishable from single use. Similarly, the combination of *A.muricata* L. decoction with high and low doses of chloramphenicol showed an increase in the zone of inhibition respectively (24.7 ± 2.08 mm; 26.3 ± 2.08 mm; 16.7 ± 14.4 mm; 13.7 ± 11.8 mm), but it was not statistically indistinguishable from single use. *E. coli* did not show an increase in the zone of inhibition in the combination of methanol extract and decoction *A.muricata* L. with high doses of chloramphenicol (0.0 ± 0.0 mm) and (12.0 ± 0.0 mm; 11.7 ± 1.1 mm).

Conclusion: The combination of methanol extract or decoction of *A.muricata* L. leaves with chloramphenicol did not increase inhibition against *S.aureus* and *E.coli*.

Keywords: *A.muricata* L., chloramphenicol, *S.aureus*, *E.coli*, antibiotic resistance

*Corresponding author:

Reza Hakim, (0341) 578920

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

e-mail: rezahakim@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Pada negara berkembang, pasien yang dirawat di rumah sakit dan mendapatkan terapi antibiotik sebesar 30-80%. Penggunaan antibiotik yang irasional dan tanpa indikasi yang jelas akan menimbulkan resistensi pada antibiotik.¹ Dua juta penduduk Amerika Serikat terinfeksi bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan setiap tahunnya 23.000 penduduk meninggal dunia.² Penelitian Antimicrobial Resistant in Indonesia (AMRIN-Study) di rumah sakit di temukan 81% *Escherichia coli* resisten terhadap antibiotik kloramfenikol (43%).³ Resistensi *Staphylococcus aureus* pada kloramfenikol di RSUD Dr. Moewardi tahun 2014 sebesar 23,6%.⁴

Strategi untuk menanggulangi resistensi antibiotik yaitu dengan menggunakan kombinasi antibiotik dan herbal yang memiliki senyawa antibakteri, untuk memperluas spektrum antibakteri dan mengurangi toksisitas.⁵ Salah satu tanaman obat di Indonesia yang mengandung zat antimikroba yaitu ekstrak daun *A.muricata L.*⁶ Uji fitokimia ekstrak metanol daun *A.muricata L.* terdapat senyawa aktif yaitu flavonoid, alkaloid dan polifenol sebagai antibiotik.⁷ Infusa daun *A.muricata L.* terdapat senyawa aktif flavonoid, polifenol dan alkaloid sebagai antibakteri. Flavonoid dan polifenol dapat merusak membran plasma pada bakteri dan alkaloid dapat merusak struktur dinding sel bakteri.⁸ Penelitian Rusmiyati *et al* (2014) didapatkan efek antibakteri ekstrak metanolik daun *A.muricata L.* terhadap *S.aureus* dan *Propionibacterium acnes* pada konsentrasi 25%.⁹ Selain itu pada penelitian Sari *et al* (2010) didapatkan efek antibakteri infusa daun *A.muricata L.* terhadap *S.aureus* dan *E.coli* secara *in vitro*.¹⁰ Kombinasi herbal dan antibiotik dapat menghasilkan efek sinergistik, aditif atau efek antagonistik terhadap kinerja antibakteri.¹¹ Pada penelitian Asyarkia (2019) kombinasi ekstrak metanolik daun *Camelia sinensis* dan antibiotik kloramfenikol dapat menghambat pertumbuhan *S.aureus*.¹² Selain itu pada penelitian Kurniawan (2019) kombinasi ekstrak metanolik dan dekokta daun *A.muricata L.* dan antibiotik amoksisilin dapat meningkatkan daya hambat pertumbuhan *S.aureus*.¹³

Belum ada data efek antibakteri kombinasi *A.muricata L.* dan kloramfenikol pada *S.aureus* dan *E.coli* secara *in vitro*. Sehingga perlu dilakukan penelitian kombinasi herbal daun *A.muricata L.* dengan antibiotik kloramfenikol sebagai *adjuvant*.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu, dan Tempat Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Herbal Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Februari – Mei 2019.

Pembuatan Ekstrak Metanol *A.muricata L.*

Pembuatan ekstrak metanol diawali dengan mempersiapkan simplisia daun *A.muricata L.* dalam bentuk serbuk yang diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Malang. Simplisia ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 40 gram dan dicampurkan dengan pelarut metanol 96% sebanyak 400 ml untuk direndam didalam *Erlenmeyer*, kemudian ditutup dengan *aluminium foil* lalu dimasukkan dalam *shaker water bath* dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah itu hasil ekstrak disaring dengan *vacum buchner* dan dievaporasi pada suhu 55°C. Selanjutnya, ekstrak dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C. Bila ekstrak telah kering dilarutkan kembali dengan metanol 96% hingga diperoleh ekstrak cair menjadi 1 gr/10 ml.¹⁴

Pembuatan Dekokta Daun *A.muricata L.*

Pembuatan dekokta diawali dengan mempersiapkan simplisia daun *A.muricata L.* dalam bentuk serbuk yang diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Malang. Pada penelitian ini menggunakan dekokta 10%. Simplisia ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 40 gram kemudian diletakkan dalam panci dekokta, lalu ditambahkan 400 ml *aquadest* ke dalam panci tersebut, dan dipanaskan selama 30 menit dengan suhu 90°C. Setelah itu, diangkat lalu disaring menggunakan *vacum buchner*.¹⁵

Pembuatan Larutan Antibiotik Kloramfenikol

Pembuatan larutan kloramfenikol dilakukan dengan menyiapkan kapsul kloramfenikol 250 mg. Kemudian serbuk kloramfenikol ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 10 ml *aquadest* steril sehingga didapat konsentrasi 100 mg/ml. Dari larutan 100 mg/ml diambil 1 ml kemudian ditambahkan *aquadest* steril hingga didapatkan konsentrasi 10 mg/ml. Dari konsentrasi 10 mg/ml diambil 1ml ditambahkan *aquadest* steril hingga 10 ml sehingga didapatkan larutan 1mg/ml.¹⁶

Pembuatan Media Biakan Pour Plate

Nutrient agar (NA) dilarutkan dalam *aquadest* steril dengan perbandingan 1:50 kemudian di *autoclave*. Setelah steril suhu media diukur menggunakan *thermometer infrared*, apabila suhu <50°C suspensi bakteri dimasukkan sebanyak 1% (5ml dalam 500ml media), selanjutnya media digoyangkan hingga suspensi bakteri tercampur rata lalu dituang ke dalam cawan petri (20-25ml).¹⁷

Uji Zona Hambat (ZOI)

Uji zona hambat diawali dengan persiapan media yang telah ditambahkan suspensi bakteri *S.aureus* dan *E.coli*. *Plating* dilakukan pada media secara merata hingga padat lalu dilubangi dengan *cork borer* berukuran 6 mm. Kemudian, pada lubang sumuran diberi tetesan larutan antibiotik dan ekstrak herbal. Uji zona hambat antibiotik dan herbal tunggal ditetaskan sebanyak 30 µl,

sedangkan pada uji zona hambat kombinasi ditetaskan masing-masing antibiotik kloramfenikol dan ekstrak *A.muricata* L. sebanyak 15 µl, sehingga diperoleh volume total 30 µl. Dosis yang digunakan pada uji zona hambat antibiotik tunggal yaitu 10 mg/ml sampai dengan 0.0010 mg/ml, dekokta daun salam tunggal digunakan 0,05 mg/ml hingga 10 kali pengenceran, dan ekstrak metanol daun salam tunggal digunakan 1 g/ml hingga 10 kali pengenceran. Dosis uji zona hambat dibagi menjadi 4, yaitu Antibiotik Dosis Tinggi (ADT) dengan hasil zona hambat tunggal >10mm, Antibiotik Dosis Rendah (ADR) dengan hasil zona hambat tunggal ≤10mm, Herbal Dosis Tinggi (HDT) dengan zona hambat tunggal >10mm, dan Herbal Dosis Rendah (HDR) dengan ZOI tunggal ≤10mm. Kemudian, media diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18 jam.¹⁸

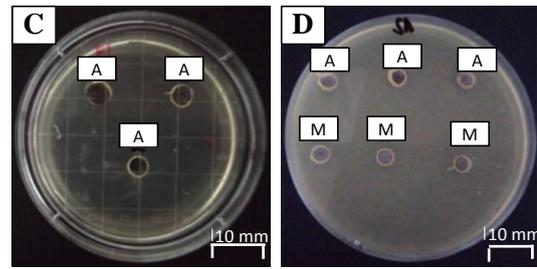
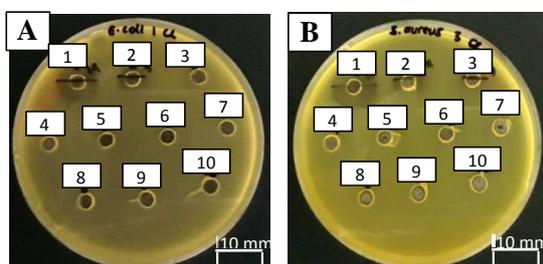
Analisa Data Statistik

Penghitungan hasil zona hambat tunggal dan kombinasi menggunakan mistar dengan tingkat ketelitian 1 mm dan data dibuat menggunakan *Microsoft Excel 2016* untuk mendapat nilai rerata dan standar deviasi. Uji statistik normalitas distribusi data menggunakan *Shapiro Wilk*, karena data terdistribusi tidak normal ($p < 0,05$), maka uji dilanjutkan menggunakan uji non-parametrik *Mann-Whitney*. Interpretasi hasil ZOI kombinasi menurut AZDAST yaitu, jika AB (kedua senyawa kombinasi yang diujikan) lebih besar dari HDR & ADR dan lebih kecil atau lebih besar dari HDT dan / atau ADT disebut sinergis. Jika AB sama dengan HDT dan / atau ADT disebut aditif. Jika AB lebih kecil dari HDR atau ADR disebut antagonis. Jika salah satu dari HDR atau ADR sama dengan nol dan AB lebih besar dari HDR & ADR dan lebih kecil atau lebih besar dari HDT dan/atau ADT disebut potensiasi. Jika AB hampir sama dengan A/B maka tidak bisa dibedakan/*not distinguishable*.

HASIL DAN ANALISA DATA

Hasil Pengukuran ZOI Kloramfenikol Tunggal

Zone Of Inhibition (ZOI) kloramfenikol tunggal terhadap *E.coli* dan *S.aureus* pada Gambar 1 dan Tabel 1 memperlihatkan bahwa pada dilusi yang sama kloramfenikol tunggal menghasilkan diameter *Zone Of Inhibition* (ZOI) yang lebih besar pada *S.aureus* daripada *E.coli*. Pada dilusi 1/4 kloramfenikol tunggal masih menghasilkan *Zone Of Inhibition* (ZOI) pada *S.aureus*, sedangkan pada *E.coli* sudah tidak didapatkan *Zone Of Inhibition* (ZOI). Hal tersebut menunjukkan bahwa kloramfenikol tunggal lebih efektif menghambat *S.aureus* dibanding *E.coli*.



Gambar 1. (A) Hasil pengukuran *zone of inhibition* (ZOI) tunggal kloramfenikol terhadap *E.coli* dan (B) pada *S.aureus*; (C) Hasil pengukuran *zone of inhibition* (ZOI) kontrol pelarut aquadest pada *S.aureus* dan (D) pada *E.coli*.

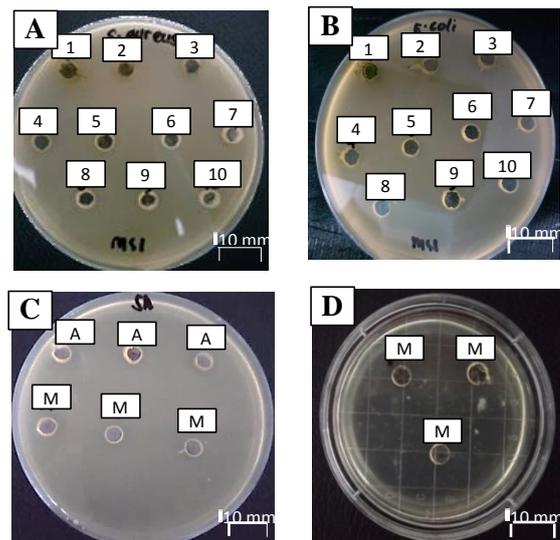
Tabel 1. Hasil Rerata dan Standart Deviasi Pengukuran *Zone of Inhibition* (ZOI) kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Sumuran ke-	Dilusi (Konsentrasi)	Rerata ± SD (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1.	1 (10 mg/ml)	16,7±0,5	13,7±1,5
2.	1/2 (5 mg/ml)	10,7±0,5	6,3±5,5
3.	1/4 (2,5 mg/ml)	3,0±5,1	0,0±0,0
4.	1/8 (1,25 mg/ml)	0,0±0,0	0,0±0,0
5.	1/16 (0,625 mg/ml)	0,0±0,0	0,0±0,0
6.	1/32 (0,3125 mg/ml)	0,0±0,0	0,0±0,0
7.	1/64 (0,1562 mg/ml)	0,0±0,0	0,0±0,0
8.	1/128 (0,0781 mg/ml)	0,0±0,0	0,0±0,0
9.	1/256 (0,0390 mg/ml)	0,0±0,0	0,0±0,0
10	1/512 (0,0195 mg/ml)	0,0±0,0	0,0±0,0

Keterangan : Tabel 1 didapat dari data kelompok.¹²

Zone of Inhibition Ekstrak Metanolik Daun *A.muricata* L terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Zone Of Inhibition (ZOI) ekstrak metanol daun *A.muricata* L. terhadap *E.coli* dan *S.aureus* pada Gambar 2 dan Tabel 2 memperlihatkan bahwa dalam berbagai dilusi ekstrak metanol daun *A.muricata* L. tunggal tidak menghasilkan diameter *Zone Of Inhibition* (ZOI) pada *S.aureus* dan *E.coli*.



Gambar 2. (A) Hasil *Zone of Inhibition* (ZOI) Ekstrak Metanolik daun *A.muricata* L. terhadap *S.aureus*; (B) *E.coli*; (C) Kontrol pelarut metanol pada *S.aureus*; (D) *E.coli*.

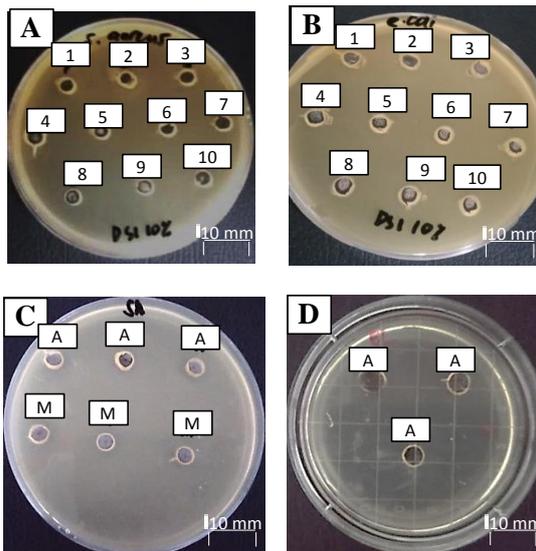
Tabel 2. Rata-rata Diameter *Zone of Inhibition* (ZOI) Ekstrak metanolik daun *A.muricata* L. terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Sumuran ke-	Dilusi	Konsentrasi (mg/ml)	Diameter ZOI	Diameter ZOI
			<i>S. aureus</i> ± SD (mm)	<i>E. coli</i> ± SD (mm)
1	1	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	½	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3	¼	2.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
4	1/8	1.25	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5	1/16	0.62	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6	1/32	0.31	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
7	1/64	0.16	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
8	1/128	0.08	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9	1/256	0.04	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10	1/512	0.02	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.¹³

Zone of Inhibition (ZOI) Dekokta Daun *A.muricata* L. terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

Zone of Inhibition (ZOI) dekokta daun *A.muricata* L. terhadap *E.coli* dan *S.aureus* pada Gambar 3 dan (Tabel 3) memperlihatkan bahwa dalam berbagai dilusi dekokta daun *A.muricata* L. tunggal tidak menghasilkan diameter *Zone of Inhibition* (ZOI) pada *S.aureus* dan *E.coli*.



Gambar 3. (A) Hasil *Zone of Inhibition* (ZOI) dekokta daun *A.muricata* L. terhadap *S.aureus*; (B) *E.coli*; (C) Kontrol pelarut aquadest pada *S.aureus*; (D) *E.coli*.

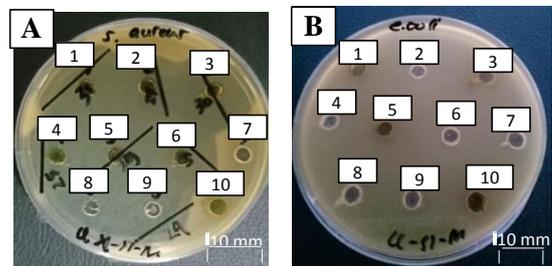
Tabel 3. Rata-rata Diameter ZOI Dekokta daun *A.muricata* L. terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Sumuran ke-	Dilusi	Konsentrasi (mg/ml)	Diameter ZOI	Diameter ZOI
			<i>S.aureus</i> ± SD (mm)	<i>E.coli</i> ± SD (mm)
1	1	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2	½	5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
3	¼	2.5	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
4	1/8	1.25	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
5	1/16	0.62	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
6	1/32	0.31	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
7	1/64	0.16	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
8	1/128	0.08	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
9	1/256	0.04	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10	1/512	0.02	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.¹³

Zone Of Inhibition (ZOI) Kombinasi Ekstrak Metanolik Daun *A.muricata* L. dengan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Zone Of Inhibition (ZOI) kombinasi ekstrak metanol daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol terhadap *E.coli* dan *S.aureus* pada Gambar 4, Tabel 4, Tabel 5 dan Tabel 6 memperlihatkan bahwa pada kelompok KDT+HDTm pada *S.aureus* dan *E.coli* bersifat *not distinguishable*/efek kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya karena tidak didapatkan peningkatan *Zone of Inhibition* (ZOI), berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang tidak signifikan ($p>0.05$) dibanding *Zone of Inhibition* (ZOI) tunggal sebagai kontrolnya. Pada kelompok KDR+HDTm pada *S.aureus* bersifat *not distinguishable*/efek kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya karena tidak didapatkan peningkatan *Zone of Inhibition* (ZOI), berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang tidak signifikan ($p>0.05$).



Gambar 4. (A) Hasil ZOI kombinasi Ekstrak Metanolik daun *A.muricata* L. dengan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan (B) *E.coli*.

Tabel 4. Rata-rata Diameter Zone of Inhibition (ZOI) kombinasi Ekstrak Metanolik daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol terhadap *S.aureus*

Sumuran ke-	Dosis	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm) <i>S.aureus</i>
1;3;5	KDT+HDTm	30,0 \pm 1,0
2;4;6	KDR+HDTm	25,0 \pm 0,0
7	-	-
8	KDT	0,0 \pm 0,0
9	KDR	24,0 \pm 0,0
10	HDTm	0,0 \pm 0,0

Keterangan: KDT, Kloramfenikol Dosis Tinggi; KDR, Kloramfenikol Dosis Rendah; HDTm, Herbal Dosis Tinggi.

Tabel 5. Rata-rata Diameter Zone of Inhibition (ZOI) kombinasi Ekstrak Metanolik daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol terhadap *E.coli*.

Sumuran ke-	Dosis	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm) <i>E.coli</i>
1;3;5	KDT+HDTm	0,0 \pm 0,0
2;4;6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	KDT	0,0 \pm 0,0
10	HDTm	0,0 \pm 0,0

Keterangan: KDT, kloramfenikol Dosis Tinggi; HDTm, Herbal Dosis Tinggi.

Tabel 6. Interaksi Kombinasi Ekstrak Metanol *A.muricata* L. dengan Kloramfenikol

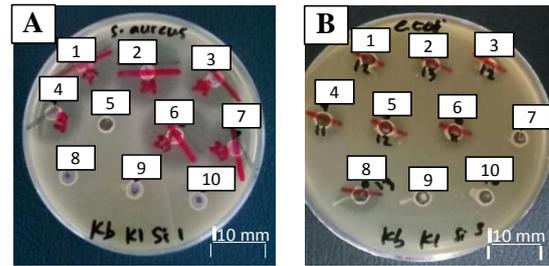
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
KDT+HDTm	ND	ND
KDT+HDRm	-	-
KDR+HDTm	-	ND
KDR+HDRm	-	-

Keterangan: KDT, kloramfenikol Dosis Tinggi; KDR, kloramfenikol Dosis Rendah; HDTm, Herbal Dosis Tinggi; HDRm, Herbal Dosis Rendah; ND, *not distinguishable/efek* kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya.

Zone of Inhibition (ZOI) Kombinasi Dekokta daun *A.muricata* L dengan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Zone of Inhibition (ZOI) kombinasi dekokta daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol terhadap *E.coli* dan *S.aureus* pada Gambar 5, Tabel 7, Tabel 8 dan Tabel 9 memperlihatkan bahwa pada kelompok KDT+HDTd dan KDT+HDRd pada *S.aureus* dan *E.coli* bersifat *not distinguishable/efek* kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya karena tidak didapatkan peningkatan Zone of Inhibition (ZOI), berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang tidak signifikan ($p > 0.05$) dibanding Zone of Inhibition (ZOI) tunggal sebagai kontrolnya. Pada kelompok KDR+HDTd dan KDR+HDRd pada *S.aureus* bersifat *not distinguishable/efek* kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya karena

tidak didapatkan peningkatan Zone of Inhibition (ZOI), berdasarkan uji statistik *Mann-Whitney Test* didapatkan interaksi dosis yang tidak signifikan ($p > 0.05$).



Gambar 5. (A) Hasil ZOI kombinasi Dekokta daun *A.muricata* L. dengan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* dan (B) *E.coli*

Tabel 7. Rata-rata Diameter ZOI kombinasi Dekokta daun *A.muricata* L. dengan Kloramfenikol terhadap *S.aureus*

Sumuran ke-	Dosis	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm) <i>S. aureus</i>
1	KDT+HDTd	24.7 \pm 2.08
2	KDT+HDRd	26.3 \pm 2,08
3	KDR+HDTd	16.7 \pm 14.4
4	KDR+HDRd	13.7 \pm 11.8
5	-	-
6	KDT	26.0 \pm 2.6
7	KDR	24.0 \pm 1.7
8	-	-
9	HDTd	2.7 \pm 4.6
10	HDRd	0.0 \pm 0.0

Keterangan: KDT, Kloramfenikol Dosis Tinggi; KDR, Kloramfenikol Dosis Rendah; HDTd, Herbal Dosis Tinggi; HDRd, Herbal Dosis Rendah.

Tabel 8. Rata-rata Diameter ZOI kombinasi Dekokta daun *A.muricata* L. dengan Kloramfenikol terhadap *E.coli*

Sumuran ke-	Dosis	Rerata $\bar{x} \pm SD$ (mm) <i>E.coli</i>
1;3;5	KDT+HDTd	12.0 \pm 0.0
2;4;6	KDT+HDRd	11.7 \pm 1.1
7	-	-
8	KDT	13.0 \pm 0.0
9	HDTd	0.0 \pm 0.0
10	HDRd	0.0 \pm 0.0

Keterangan: KDT, Kloramfenikol Dosis Tinggi; HDTd, Herbal Dosis Tinggi; HDRd, Herbal Dosis Rendah.

Tabel 9. Interaksi Kombinasi Dekokta Daun *A.muricata* L. dengan Kloramfenikol terhadap *S.aureus* atau *E.coli*

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
KDT+HDTd	ND	ND
KDT+HDRd	ND	ND
KDR+HDTd	-	ND
KDR+HDRd	-	ND

Keterangan: KDT, kloramfenikol Dosis Tinggi; KDR, kloramfenikol Dosis Rendah; HDTd, Herbal Dosis Tinggi;

HDRd, Herbal Dosis Rendah; ND, not distinguishable/efek kombinasi tidak ada perbedaan dari penggunaan tunggalnya.

PEMBAHASAN

Daya Hambat Antibiotik Kloramfenikol Tunggal Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Pada penelitian ini zona hambat yang dihasilkan pada *S.aureus* lebih efektif dibandingkan pada *E.coli*. Pada penelitian Kusumawati (2019) menunjukkan adanya zona inhibisi terhadap bakteri *S.aureus* dengan dilusi 1/2 (Konsentrasi 0,5 mg/ml) 32,67 mm - 1/64 (Konsentrasi 0,0625 mg/ml) 11,67 mm dan pada *E. coli* didapatkan zona inhibisi pada dilusi 1/2 (Konsentrasi 0,5 mg/ml) 34,67 mm – 1/32 (Konsentrasi 0,031 mg/ml) 12,00 mm.¹⁹

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kloramfenikol memiliki daya hambat yang lebih baik terhadap *S.aureus* dibandingkan *E. coli*. Hal ini dikarenakan *S.aureus* hanya memiliki satu membran plasma yang dikelilingi oleh dinding sel berupa peptidoglikan, sedangkan *E.coli* memiliki membran ganda yaitu membran plasma yang dikelilingi oleh membran luar yang permeabel. Sehingga penetrasi zat kloramfenikol lebih sulit untuk menembus bakteri *E.coli* dibandingkan *S.aureus*.²⁰

Mekanisme kerja Kloramfenikol mengikat subunit ribosom 50S, sehingga Kloramfenikol menghalangi pengikatan ujung tRNA aminoasil yang mengandung asam amino dengan subunit ribosom 50S. Mekanisme Kloramfenikol tersebut dapat menyebabkan enzim peptidil transferase dengan substrat asam amino tidak terjadi, sehingga sintesis protein terhambat.²¹ Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar ZOI yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Hal tersebut sejalan dengan teori apabila semakin tinggi konsentrasi antibiotik maka semakin besar jumlah senyawa antibakteri yang dilepaskan sehingga memudahkan senyawa tersebut untuk melakukan penetrasi ke dalam sel bakteri.²²

Adanya perbedaan hasil yang diperoleh diduga karena beberapa faktor, seperti dosis yang terlalu rendah dan proses pelarutan. Adanya zat pembawa yang terkandung dalam kapsul kloramfenikol diduga dapat mempengaruhi kadar dari antibiotik sehingga mempengaruhi luas zona hambat pada bakteri. Sediaan kapsul kloramfenikol mengandung tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 120% dari jumlah yang tertera pada etiket. Studi literatur menyebutkan bahwa kadar kloramfenikol 1 gram akan larut sempurna dalam 400 ml air.²³ pada penelitian ini belum mencapai tingkat kelarutan sempurna dengan dosis 1 gram dilarutkan dengan 100ml *aquadest* sehingga mempengaruhi hasil zona hambat yang dihasilkan. Pemilihan pelarut *aquadest* memiliki kelemahan yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi fermentatif dimana dapat mempercepat rusaknya komponen senyawa antibiotik dan rentan mengalami kontaminasi jamur.²⁴

Dugaan lain yang dapat menyebabkan perbedaan hasil zona hambat pada kloramfenikol

adalah penentuan dosis yang terlalu rendah sehingga menghasilkan zona hambat yang lebih kecil pada *E. coli* dari penelitian yang telah dilakukan. Akan tetapi, pada *S. aureus* didapatkan zona hambat yang lebih tinggi dibandingkan penelitian sebelumnya dikarenakan pada dilusi 1/1 dengan kadar 10 mg/ml sudah memberikan daya hambat yang cukup baik. Studi lain disebutkan bahwa kloramfenikol pada konsentrasi 1-10 µg/ml telah mampu memberikan efek antibakteri terhadap bakteri gram positif dan pada konsentrasi 0,2-5 µg/ml terhadap bakteri gram negatif.²⁵

Didapatkan kemungkinan lain bahwa strain bakteri yang digunakan di Laboratorium Mikrobiologi FK Unisma telah mengalami resistensi terhadap kloramfenikol. Data menunjukkan bahwa resistensi terhadap kloramfenikol mengalami peningkatan pada bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dari tahun 2010 hingga 2012 pada beberapa rumah sakit di Surabaya.²⁶ Oleh karena itu, pemberian kloramfenikol pada konsentrasi yang diujikan tidak terlalu menunjukkan daya hambat terhadap kedua bakteri tersebut.

Daya Hambat Ekstrak Metanolik dan Dekokta Daun *A.muricata* L. Tunggal Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Pada penelitian ini ekstrak metanolik dan dekokta daun *A.muricata* L. terhadap *S.aureus* dan *E.coli* tidak mampu menghambat pertumbuhan *S.aureus* maupun *E.coli*. Sedangkan pada penelitian Rusmiyati *et al.*, (2014) terbentuk ZOI dari ekstrak metanol daun muda sirsak *A.muricata* L. dengan konsentrasi dan diameter 5% (12,5mm), 10% (14mm), 15% (15mm), 20% (16,5mm) dan 25% (18mm) terhadap *S.aureus* yang diinkubasi selama 24 jam.⁹ Pada penelitian Hidana *et al.*, (2014) mengungkapkan bahwa pada mengungkapkan bahwa pada konsentrasi ekstrak *A.muricata* L. 100% (25mm), 90% (24,5mm), 80% (18,5mm), 70% (16,5mm), 60% (14,5mm), 50% (14mm), 40% (11mm), 30% (8mm), dan 20% (6mm) terbentuk zona jernih, yang berarti pada konsentrasi tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*.²⁷

Hal tersebut terjadi karena terdapat berbagai faktor yang tidak dapat dikontrol yang dapat mempengaruhi hasil dari penelitian ini seperti lingkungan tempat tanaman berasal, proses pembuatan ekstrak dan waktu inkubasi. Daun *A.muricata* L. yang digunakan dalam penelitian oleh Pomalingo (2014) berasal dari desa Kasia Kabupaten Gorontalo Utara, dimana ekstrak *A.muricata* L. menunjukkan daya hambat pada konsentrasi 25%, 35% dan 45% terhadap bakteri *S.aureus* dengan adanya ZOI yang terbentuk pada media uji. Hal tersebut menggambarkan faktor tanaman berasal untuk pembandingan tanaman herbal yang digunakan dalam penelitian ini.²⁸ Kandungan senyawa metabolit sekunder suatu tumbuhan dapat bervariasi karena kondisi lingkungan, jenis, kondisi fisiologis dan juga sifat kimianya.²⁹ Dugaan faktor lingkungan seperti suhu udara, kelembapan relatif,

radiasi matahari, angin, suhu tanaman, ketersediaan air, kecukupan cahaya dalam proses fotosintesis sangat mempengaruhi fungsi fisiologis, bentuk anatomis, dan siklus hidup tumbuhan. Penyesuaian oleh tumbuhan biasanya cenderung mengikuti perubahan alam yang terjadi.³⁰ Selain itu senyawa Flavonoid, saponin serta beberapa senyawa alkaloid memiliki sifat tidak tahan terhadap panas.³¹ Suhu tinggi dan waktu ekstraksi yang lama dapat menyebabkan epimerisasi, oksidasi dan degradasi senyawa aktif daun *A.muricata* L.³² Pemilihan pelarut akuades memiliki kelemahan yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi fermentatif dimana dapat mempercepat rusaknya komponen senyawa aktif dan rentan mengalami kontaminasi oleh bakteri lain dan jamur.²⁴ Waktu inkubasi juga mempengaruhi daya hambat dekoka, sesuai hasil penelitian Pratama *et al.*, (2016) yang menyimpulkan bahwa semakin lama waktu inkubasi maka semakin menurunkan aktivitas dekoka dalam menghambat pertumbuhan bakteri.³³

Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Metanolik dan Dekoka Daun *A.muricata* L. dengan Kloramfenikol Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil penelitian ini didapatkan kombinasi ekstrak metanol dan dekoka daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol terhadap *S.aureus* menunjukkan peningkatan zona inhibisi, tetapi secara statistik tidak terdapat interaksi atau tidak dapat dibedakan dari penggunaan tunggalnya. Tetapi pada kombinasi ekstrak metanol dan dekoka daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol terhadap *E.coli* tidak menunjukkan peningkatan zona inhibisi.

Hal tersebut dapat terjadi karena beberapa faktor seperti, proses pelarutan antibiotik, penentuan dosis yang terlalu rendah dan proses pembuatan ekstrak. Studi literatur disebutkan bahwa kadar kloramfenikol 1 gram akan larut sempurna dalam 400 ml air.²³ Dimana pada penelitian ini belum mencapai tingkat kelarutan kloramfenikol yang sempurna dengan dosis 1 gram dilarutkan dengan 100ml *aquadest* sehingga mempengaruhi hasil zona hambat yang dihasilkan. Pemilihan pelarut *aquadest* memiliki kelemahan yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi fermentatif dimana dapat mempercepat rusaknya komponen senyawa antibiotik dan rentan mengalami kontaminasi oleh bakteri lain dan jamur.²⁴ Selain itu penentuan dosis yang terlalu rendah sehingga menghasilkan zona hambat yang lebih kecil pada *E. coli* dari penelitian yang telah dilakukan. Akan tetapi, pada *S. aureus* didapatkan zona hambat yang lebih tinggi dibandingkan penelitian sebelumnya dikarenakan pada dilusi 1/1 dengan kadar 10 mg/ml sudah memberikan daya hambat yang cukup baik. Studi lain disebutkan bahwa antibiotik kloramfenikol pada konsentrasi 1-10 µg/ml telah mampu memberikan efek antibakteri terhadap bakteri gram positif dan pada konsentrasi 0,2-5 µg/ml terhadap bakteri gram negatif.²⁵

Secara umum pelarut metanol banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan sebagian besar golongan senyawa.³⁴ Pelarut metanol merupakan pelarut dengan tingkat polaritas tinggi sehingga dapat melarutkan senyawa aktif dalam *A.muricata* L.³⁵ Senyawa golongan flavonoid, saponin dan alkaloid yang terkandung dalam *A.muricata* L. yang dapat merusak dinding sel bakteri sehingga komponen utama dari sel keluar dan menyebabkan kematian sel bakteri.¹⁰ Akan tetapi, senyawa golongan flavonoid, saponin dan alkaloid dari ekstrak metanol *A.muricata* L. memiliki karakteristik yang tidak tahan terhadap panas.^{31,36} Hal tersebut diduga dapat menjadi penyebab penurunan kadar flavonoid pada ekstrak metanol *A.muricata* L. yang berdampak pada aktivitas antibakteri yang ditimbulkan. Penggunaan pelarut akuades memiliki kelemahan yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi fermentatif dimana dapat mempercepat rusaknya komponen senyawa antibiotik dan rentan mengalami kontaminasi oleh bakteri lain dan jamur sehingga dapat menurunkan efektifitas zat aktif herbal.²⁴

Kombinasi ekstrak metanol *A.muricata* L. dengan kloramfenikol secara teori menunjukkan interaksi antara obat dengan senyawa aktif dari herbal. Flavonoid yang merupakan senyawa aktif tercampur sebagai glikosida pada jaringan tumbuhan.³⁷ Sedangkan kloramfenikol memiliki interaksi yang dapat mengendapkan beberapa obat dari golongan aminoglikosida sehingga dapat menekan aktivitas antibakteri jika diberikan bersamaan.³⁸ Diduga efek kombinasi ekstrak metanol *A.muricata* L. dengan kloramfenikol terhadap *E.coli* dipengaruhi oleh interaksi antara obat dan senyawa aktif herbal sehingga efek pada bakteri gram negatif yang memiliki struktur yang lebih kompleks saling meniadakan.

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.³⁹ Konsentrasi kloramfenikol akan meningkat ketika terjadi hambatan *efflux pump* oleh senyawa tanin daun *A.muricata* L. sehingga dapat meningkatkan aktivitas antibakteri kloramfenikol. Namun, dari hasil penelitian kombinasi dekoka daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol menunjukkan efek yang tidak berbeda signifikan. Diduga kadar senyawa aktif yang berinteraksi dengan antibiotik mengalami penurunan karena aktivitas hambatan pompa efluks tidak bekerja maksimal sehingga tidak menghambat aktivitas bakteri.

Pada penelitian Kurniawan (2019) didapatkan hasil kombinasi ekstrak metanol *A.muricata* L. dengan amoksisilin bersifat ND (*not distinguishable*) pada *E.coli*.¹³ Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan bahwa ekstrak metanol *A.muricata* L. tidak mampu meningkatkan efek terapi utama. Sehingga diduga

penggunaan ekstrak metanol dan kloramfenikol pada bakteri gram negatif kurang efektif dalam meningkatkan kerja terapi utama.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah:

1. Kombinasi ekstrak metanol daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol tidak meningkatkan daya hambat terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.
2. Kombinasi dekokta daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol tidak meningkatkan daya hambat terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.
3. Kombinasi ekstrak metanol daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol bersifat *not distinguishable* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.
4. Kombinasi dekokta daun *A.muricata* L. dengan kloramfenikol bersifat *not distinguishable* terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

SARAN

Saran yang dapat dilakukan untuk meningkatkan penelitian ini:

1. Melakukan penelitian dengan dosis kloramfenikol dan herbal yang sesuai.
2. Mengurangi jumlah hole dalam 1 plate 5-7 sehingga didapatkan hasil clear zone yang lebih maksimal.
3. Melakukan penelitian analisa fitokimia dekokta dan ekstrak metanol daun *A.muricata* L. secara lebih terstandar.
4. Melakukan penelitian lanjutan dengan meminimalisir terjadinya bias pada antibiotik, suhu yang digunakan, pelarut yang digunakan, dan simplisia yang digunakan.
5. Melakukan pembuatan larutan antibiotik kloramfenikol standar dengan pelarut yang tepat sesuai sifat kelarutan dari antibiotik.
6. Menggunakan kloramfenikol sediaan murni.
7. Melakukan uji *in vivo* untuk mengetahui respon kombinasi dari daun *A.muricata* L. sebagai terapi tambahan.

UCAPAN TERIMAKASIH

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. Mahmudah, F., Sumiwi, A.S., Hartini, S. Studi Penggunaan Antibiotik Berdasarkan ATC/DDD dan DU 90% di Bagian Bedah Digestif di Salah Satu Rumah Sakit di Bandung. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia*; 5(4):293-298. 2016.
2. Desrini, Sufi. Resistensi Antibiotik, Akankah Dapat Dikendalikan ?. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*; 6(4):1-2. 2015.
3. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2406/Menkes/Per/XII/2011 tentang Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik. Kemenkes. Jakarta. 2011.
4. Kemenkes Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia No.8 Thn.2015 Tentang Program Pengendalian Resistensi Antimikroba di Rumah Sakit. Jakarta. 2015.
5. Aiyegoro, A. O., Afolayan, A. J. & Okoh, A. I. In Vitro Antibacterial Activities of Crude Extracts of The Leaves of *Helichrysum longifolium* In Combination with Selected Antibiotics. *African J. Pharm. Pharmacol.* 3, 293-300. 2009.
6. Apriliana, E., Syafira A.U. Ekstraksi Daun Sirsak (*Annona muricata*) sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. *Majority*; 5(1):1-5. 2016.
7. Kurang, Y. R., Adang, B. Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (*Annona muricata* L) Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrylhidrazil (Dpph). Program Studi Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tribuana Kalabahi. 23(01): 567 – 574. 2018.
8. Sari, D.Y., Djannah, N.S., Nurani, H.L. Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) secara in vitro Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. *Jurnal Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Ahmad Daulan*; 4(3):144-239. 2010.
9. Rusmiyati, I. Husain, DR. Alam, G. Bioaktivitas Ekstrak Metanol Daun Muda Sirsak *Annona muricata* L. sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. *[Jurnal].Universitas Hasanuddin*. Makassar. 2014.
10. Sari, D.Y., Djannah, N.S., Nurani, H.L. Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) secara in vitro Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. *Jurnal Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Ahmad Daulan*; 4(3):144-239. 2010.
11. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., and Collins, J. J. How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nature Reviews Microbiology*. 8 : p. 423-425. 2010.
12. Asyarkia, L. N., Hakim, R., Sulistyowati, E. Efek Antibakteri Kombinasi Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.) Dan Kloramfenikol Pada Bakteri *Escherichia coli* Atau *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*; 6(3) . 2019.
13. Kurniawan, D., Hakim, R., Sulistyowati, E. Efek Antibakteri Kombinasi Ekstrak

- Metanolik Atau Dekokta Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Dengan Amoksisilin Pada Bakteri *Staphylococcus aureus* Atau *Escherichia coli* Secara *In Vitro*. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*; 6(3). 2019.
14. Irwanto. 2010. Ekstrksi Menggunakan Proses Infudasi, Maserasi dn Perkolasi. Jakarta
 15. Kusumaningrum, A., Widiyaningrum, P., Mubarak, I. Penurunan Total Bakteri Daging Ayam dengan Perlakuan Perendaman Infusa Dedaunan Salam (*Syzygium polyanthum*). *Jurnal MIPA*. Universitas Negeri Semarang .36: p. 14-19. 2013.
 16. Pratiwi, S. T. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta. 2008.
 17. Risandiansyah, Rio. Induction of Secondary Metabolism Across Actinobacterial Genera (Thesis). South Australia: Flinders University. 2016.
 18. Sudirman, T. A., Uji Efektivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. 2014.
 19. Kusumawati, DA. Riandiansyah, R. Yahya, A. Efek Kombinasi Ekstrak Metanolik Lengkuas (*Alpinia Galanga*) dengan Amoxicillin, Chloramphenicol atau Cotrimoxazole terhadap daya hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli*. Malang. FK UNISMA. 2019.
 20. Jawetz. E, Melnick. J, Aldenberg E. *Medical Microbiology Twenty-Sixth Edition*. the McGraww-Hill Companies. United State. 2013.
 21. Katzung, Bertram G. *Farmakologi Dasar dan Klinik*, Ed. 12, Vol.2. EGC. Jakarta. 2013.
 22. Brooks GF, Morse SA, Butel JS, Carroll KC, Mietzner TA. *Mikrobiologi kedokteran*. Edisi Ke-25. Jakarta: EGC. 2013.
 23. Connors, K.A., Amidon, G.L., dan Stella, V.J., *Chemical Stability of Pharmaceuticals A Handbook for Pharmacist*, 2nd Ed, 264-273, John Wiley and Sons, New York. 1986.
 24. Hardiningtyas, S.D. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak Sarcophyton sp. yang Difragmentasi dan Tidak Difragmentasi Di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. SKRIPSI. FMIPA. IPB. 2009.
 25. Deck, Daniel H., PharmD, and Winston, Lisa G. *Tetracycline, Macrolides, Clindamycin, Chloramphenicol, Streptogramins, and Oxazolidinones dalam Basic and Clinical Pharmacology 13th Edition*. Bertram G. Katzung and Anthony J. Trevor editor. California : Mc Graw Hill. 2015.
 26. Hadi, Usman, Kuntaman, Qibtiyah, Mariyatul, Paraton, Hari. Problem of Antibiotic Use and Antimicrobial Resistance in Indonesia: Are We Really Making Progress?. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*. 4. p 5-8. 2013.
 27. Hidana, R., Hayati, M. A. F. Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*, *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 11, 156-160. 2014.
 28. Pomalingo, SM. Uji Daya Hambat Ekstrak Metanol Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. Other thesis, Universitas Negeri Gorontalo. 2014.
 29. Simbala, H. The Analysis of alkaloid compounds of some medicinal vegetations as the active materials of phytopharmaca.. *Pacific Journal*, Vol.1 (4); 489-494. 2009.
 30. Hilmanto, R. Indikator Ekologi Pada Waktu Tanam sebagai Inovasi Masyarakat Lokal dalam Menghadapi Dampak Negatif Perubahan Iklim. <http://Ejurnal.bppt.co.id/>, diakses pada tanggal 17 Desember 2020. 2011.
 31. 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.
 32. 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*. 96:597-605. 2006.29.
 33. 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 Komplementer Medicine*. 3(1). 2016.
 34. Redha, A. Efek Lama Maserasi Bubuk Kopro Terhadap Rendemen, Densitas, dan Bilangan Asam Biodiesel yang Dihasilkan dengan Metode Transesterifikasi In Situ. 2013.
 35. Ningsih, R.D., Kartika D, dkk. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak Sebagai Antibakteri. *Molekul*. Vol 11 NO.1 ; 101-111. 2016.
 36. Sarker, S.D., Zahid, Latif, Alexander, I Gray. *Methods in Biotechnology: Natural Products Isolation 2nd ed*. Human Press, New Jersey. 2006.
 37. Winarto W. P., *Memanfaatkan Bumbu Dapur untuk Mengatasi Aneka Penyakit*. Jakarta: Agromedia Pustaka. 2004.
 38. Friambodo, B., Purnomo, Y., Dewi, Ariani R. Efek Kombinasi Amoksisilin dan Kloramfenikol terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. *Journal of Islamic Medicine Research*. Vol. 1. p.12-20. 2017.
 39. Li, X-Z. & Nikaido, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update, *Drugs*, 69, 1555–1623. 2009.