

**EFEK KOMBINASI EKSTRAK METANOLIK LENGKUAS (*ALPINIA GALANGA*)
DEGAN AMOXICILLIN, CHLORAMPHENICOL ATAU COTRIMOXAZOLE TERHADAP
DAYA HAMBAT PERTUMBUHAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATAU *ESCHERICHIA
COLI***

Dewi Ayu Kusumawati, Rio Risandiansyah, Arif Yahya
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang
Email: kusumawatiayudewi@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan: Salah satu upaya pencegahan resistensi adalah mengombinasikan antibiotik dan bahan alam yang mempunyai aktivitas antibakteri, salah satunya lengkuas (*Alpinia galanga*). Tujuan penelitian ini untuk menguji perubahan daya hambat Amoxicillin (AMX), Chloramphenicol (CLO) atau Cotrimoxazole (COT) setelah dikombinasi dengan ekstrak metanolik Lengkuas (L) terhadap *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) dan *Escherichia coli* (*E.coli*)

Metode: Uji Zona Inhibisi (ZOI) dilakukan dengan metode sumuran pada antibiotik dan kombinasinya dengan lengkuas mengikuti metode AZDAST. Uji KHM (Kadar Hambat Minimum) dilakukan secara makrodilusi dengan mengamati kekeruhan dan endapan. Uji Kadar Bunuh Minimum (KBM) dilakukan pada 2 dosis diatasnya KHM dan 2 dosis dibawahnya. Hasil KHM dan KBM digunakan untuk menghitung *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) dan *Fractional Bactericidal Concentration Index* (FBCI). Sinergis jika bernilai < 0,5, aditif jika bernilai 0,5-4,0 dan antagonis jika bernilai >4,0.

Hasil: Berdasarkan uji ZOI dan KHM ekstrak lengkuas tunggal lebih efektif terhadap *S.aureus*. Nilai FICI dari kombinasi L dengan AMX dan CLO pada *S.aureus* adalah 4,0 dan 2,0. Kombinasi dengan AMX, CLO atau COT pada *E.coli* adalah 2,0, 1,0 dan 2,0, sedangkan kombinasi dengan COT pada *S.aureus* adalah 8,0. Nilai FBCI dari kombinasi L dengan AMX, CLO atau COT pada *S.aureus* adalah 3,0 dan kombinasi CLO dan COT pada *E.coli* adalah 4,0 dan 2,25, sedangkan kombinasi AMX pada *E.coli* bernilai 5,0.

Kesimpulan: Pada Uji KHM kombinasi Lengkuas dengan AMX dan CLO pada *S.aureus* dan kombinasi Lengkuas dengan AMX, CLO dan COT pada *E.coli* bersifat aditif, sedangkan kombinasi dengan COT terhadap *S.aureus* bersifat antagonis. Pada uji KBM kombinasi Lengkuas dengan AMX pada *E.coli* bersifat antagonis, sedangkan kombinasi yang lain bersifat aditif.

Kata Kunci: Lengkuas, Amoxicillin, Chloramphenicol, Cotrimoxazole, ZOI, KHM, KBM, *S.aureus*, *E.coli*

**COMBINATION EFFECT OF LENGKUAS METHANOLIC EXTRACT (*ALPINIA
GALANGA*) WITH AMOXICILLIN, CHLORAMPHENICOL OR COTRIMOXAZOLE TO
GROWTH INHIBITION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* OR *ESCHERICHIA COLI***

Dewi Ayu Kusumawati, Rio Risandiansyah, Arif Yahya
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang
Email: kusumawatiayudewi@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: One effort to prevent resistance is to combine antibiotics and natural ingredients that have antibacterial activity, among which is lengkuas (*Alpinia galanga*). The purpose of this study was to examine changes in Amoxicillin (AMX), Chloramphenicol (CLO) or Cotrimoxazole (COT) to inhibit bacterial growth after combined with Lengkuas methanolic extract (L) on *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) and *Escherichia coli* (*E.coli*)

Method: Zone of Inhibition (ZOI) was measure using well assay on antibiotics and combination with lengkuas following AZDAST methodology. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined using macrodilution by observing turbidity and sediment. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was performer on 2 doses above MIC and 2 doses below. MIC and MBC used to calculate the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) and Fractional Bactericidal Concentration Index (FBCI). Whereas synergistic if < 0.5, additive if 0.5-4.0 and antagonist if > 4.0.

Results: Based on ZOI and MIC Lengkuas extract was interacting more effective on the bacteria *S.aureus* when alone. The FICI value of combination of a L with AMX and CLO on *S.aureus* is 4.0 and 2.0. The combination with AMX, CLO and COT in *E.coli* were 2.0, 1.0 and 2.0, whereas the combination with COT on *S.aureus* was 8.0. The FBCI value of the combination of a L with AMX, CLO or COT on *S.aureus* is 3.0 and the combination of CLO and COT on *E.coli* is 4.0 and 2.25, while the AMX combination in *E.coli* is 5.0

Conclusion: The MIC combined of Lengkuas with AMX and CLO on *S.aureus* and combination with AMX, CLO and COT on *E.coli* are additive, whereas combination with COT on *S.aureus* are antagonistic. The MBC combined of Lengkuas with AMX on *E.coli* is antagonist, whereas other combinations are additive.

Keywords: Lengkuas, Amoxicillin, Chloramphenicol, Cotrimoxazole, ZOI, MIC, MBC, *S.aureus*, *E.coli*

PENDAHULUAN

Penyakit akibat infeksi bakteri merupakan penyakit yang banyak diderita masyarakat terutama di negara berkembang seperti Indonesia. Penyakit infeksi menyebabkan kematian 3,5 juta orang setiap tahun¹. Berdasarkan hasil Riset Kesehatan Dasar pada tahun 2013 menyatakan penyakit infeksi dapat dilihat dari beberapa data seperti Infeksi Saluran Pernapasan (ISPA) memiliki angka prevalensi sebesar 25 %, pneumonia memiliki insiden 1,8 % dan prevalensi 4,5 %, hepatitis memiliki angka prevalensi dua kali lebih tinggi pada tahun 2013 dibandingkan tahun 2007 yakni 1,2 %, sedangkan untuk diare memiliki insiden dan prevalensi pada semua umur di Indonesia adalah 3,5 % dan 7,0 %².

Gold standart untuk mengatasi penyakit infeksi adalah dengan menggunakan antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik yang luas dan irasional (tidak tepat indikasi, durasi dan dosis) menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik³. Resistensi antibiotik sudah menjadi pandemi global dan salah satu kecemasan dunia yang terbesar⁴. Salah satu contoh bakteri yang mengalami resistensi antibiotik adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Menurut data WHO, pada tahun 2013 terdapat 480.000 kasus baru multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) di dunia⁵, sedangkan penelitian terkait resistensi terhadap *Staphylococcus aureus* di RSUD Dr. Soetomo Surabaya, terbanyak terjadi pada penisilin (87,5%) : Ampisilin, dan Amoxicillin (75%)⁶. Pada bakteri *E. Coli* juga bersifat resistensi terhadap antibiotik seperti ampicilin, kloramfenikol dan trimetoprim-sulfametoksazol⁷.

Salah satu upaya dalam mencegah resistensi tersebut adalah dengan mengkombinasikan antibiotik dan bahan alam yang mempunyai aktivitas antibakteri⁸. Tanaman yang mempunyai aktivitas antibakteri yang banyak tumbuh di Indonesia adalah Lengkuas (*Alpinia galanga*). Lengkuas mengandung minyak atsiri, flavonoid dan senyawa fenol yang kandungan tersebut bersifat sebagai bakterisidal^{9,10,11}. Senyawa tersebut sering dipergunakan sebagai bahan dasar obat-obatan modern alami¹². Dalam penelitian ini, penggunaan ekstrak lengkuas dikombinasikan dengan antibiotik Amoxicillin (AMX) atau Chloramphenicol (CLO) atau Cotrimoxazole (COT). Tujuan dari kombinasi tersebut adalah untuk meningkatkan aktivitas antibakteri dari antibiotik. Selain itu penggunaan bahan alam mempunyai beberapa kelebihan yaitu mudah di dapat, ekonomis dan mempunyai efek samping yang rendah¹³.

METODE PENELITIAN

Design, Waktu, dan Tempat Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan April-September 2018.

Pembuatan Ekstrak Lengkuas

Pada penelitian ini menggunakan herbal Lengkuas (*Alpinia galanga*) yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT).

Pertama simplisia ditimbang dengan neraca digital 20gr dan dilarutkan menggunakan methanol 96% 200 ml dengan perbandingan 1:10 (gr/ml) kemudian direndam didalam Erlenmeyer dan ditutup aluminium foil. Kemudian dimasukkan *Shaker Water Bath* selama 18-24 jam dengan kecepatan 4. Setelah itu hasil ekstrak disaring dan di evaporasi. Hasil dari evaporasi dimasukkan kedalam oven hingga menjadi ekstrak kental. Kemudian diencerkan kembali dengan methanol 96%.

Pengujian Zona Inhibisi (ZOI)

Pengujian ZOI menggunakan metode A Z D A S T dengan kombinasi sumuran. Apabila ditemukan zona bening disekitar dari lubang menandakan bahan coba tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pertama mempersiapkan media biakan yang telah diinokulasi *S.aureus* dan *E.coli* dengan suspensi 10^8 CFU/ml. Kemudian media dilubangi dengan *cork-borer* dengan diameter ± 6 mm sebanyak 6-8 lubang. Antibiotik dan lengkuas diencerkan beberapa konsentrasi sesuai dosis yang digunakan. Lubang yang telah dibuat masing-masing berisikan lengkuas atau antibiotik sebanyak 30 μ l untuk tunggal, sedangkan untuk kombinasi menggunakan perbandingan 1:1 dengan total 30 μ l pada tiap lubang. Kemudian dimasukkan inkubator dengan suhu 37 °C selama 18-24 jam.

Uji ZOI kombinasi menggunakan dua dosis yang berbeda. Dosis yang pertama yaitu Antibiotik Dosis Rendah (ADR) dan Herbal Dosis Rendah (HDR) adalah hasil ZOI tunggal dengan diameter >10 mm sebelum *clear zone* menghilang, yang kedua yaitu Antibiotik Dosis Tinggi (ADT) dan Herbal Dosis Tinggi (HDT) adalah hasil ZOI tunggal dengan 4 kali dari dosis rendah. Dosis antibiotik dan Lengkuas (L) pada *S.aureus* dan *E.coli* terdapat pada **tabel 1**.

Tabel 1. Dosis Antibiotik dan lengkuas pada *S.aureus* dan *E.coli*

Bakteri	Model Dosis	Dilusi (konsentrasi (mg/ml))			
		L	A M X	C L O	C O T
<i>S.aureus</i>	A D T	-	1/8(0,125)	1/16 (0,0625)	¼ (0,25)
	A D R	-	1/32 (0,031)	1/64 (0,015)	1/16(0,0625)
	H D T	1/2 (0,5)	-	-	-
	H D R	1/16 (0,0625)	-	-	-
<i>E.coli</i>	A D T	-	1/8(0,125)	1/8 (0,125)	¼ (0,25)
	A D R	-	1/32(0,031)	1/32 (0,031)	1/16(0,0625)
	H D T	½ (0,5)	-	-	-
	H D R	¼ (0,25)	-	-	-

Keterangan: A D T, Antibiotik Dosis Tinggi; A D R, Antibiotik Dosis Rendah; H D T, Herbal Dosis Tinggi; H D R, Herbal Dosis Rendah; L, Lengkuas; A M X, Amoxicillin; C L O, Chloramphenicol; C O T, Cotrimoxazole; -, Tidak diuji.

Pengujian Kadar Hambat Minimum (KHM)

Uji kadar hambat minimum dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dari antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah inkubasi selama 24 jam. Dalam pengujian ini menggunakan metode makrodilusi serta menggunakan 3 replikat dan 2 kontrol yaitu kontrol positif dan negatif.

Tahap pertama, menyiapkan tabung reaksi, pengenceran antibiotik, lengkuas, dan bakteri. *S.aureus* dan *E.coli* menggunakan suspensi 10^7 CFU/ml. Masing-masing tabung diisi lengkuas, antibiotik, *nutrient broth* dan bakteri. Pada KHM tunggal tiap tabung diisi lengkuas atau antibiotik, *nutrient broth* dan bakteri dengan perbandingan 2:1:1 hingga total 2ml, sedangkan KHM kombinasi dengan perbandingan 1:1:1:1 hingga total 2ml. Untuk kontrol positif tiap tabung diisi bakteri, *nutrient broth* dan aquadest dan kontrol negatif diisi NaCl, *nutrient broth*, dan aquadest. Perbandingan untuk kontrol yaitu 1:1:1. Kemudian diinkubator selama 24jam. Setelah itu dilakukan pengukuran dan dievaluasi menggunakan *Checkerboard assay* dengan rumus:

$$\sum FICI = \frac{MIC_{combination\ a}}{MIC_{alone\ a}} + \frac{MIC_{combination\ b}}{MIC_{alone\ b}}$$

Apabila hasilnya bernilai <0,5 maka kombinasi bersifat sinergis yaitu efek kombinasi senyawa aktif gabungan lebih besar dibandingkan dengan efek senyawa aktif saat bekerja secara tunggal, jika bernilai 0,5-4,0 maka kombinasi bersifat aditif yaitu efek kombinasi senyawa aktif gabungan sama dengan kerja senyawa aktif bila bekerja secara tunggal, dan jika bernilai >4,0 maka kombinasi dikatakan bersifat antagonis yaitu efek kombinasi senyawa aktif gabungan lebih kecil daripada

penggunaan senyawa aktif itu jika bekerja secara tunggal.

Pengujian Kadar Bunuh Minimum (KBM)

Kadar Bunuh Minimum dilakukan untuk melihat konsentrasi terkecil dari antibakteri yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri. Untuk menentukan KBM, tabung reaksi yang digunakan untuk menilai KHM baik tunggal maupun kombinasi masing – masing tabung diambil 10 µl kemudian di teteskan kedalam media agar yang terlebih dahulu telah diisi *Nutrient agar* dan digambar kotak-kotak dengan ukuran 1,5 cm x 1,5 cm. Kemudian media agar yang telah ditetesi dimasukkan inkubator selama ±18-24jam dengan suhu 37°C. Konsentrasi yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri dinyatakan sebagai KBM, yaitu konsentrasi terkecil yang mampu membunuh bakteri uji

Selanjutnya dilakukan evaluasi menggunakan *Checkerboard assay* dengan rumus:

$$\sum FBCI = \frac{MBC_{combination\ a}}{MBC_{alone\ a}} + \frac{MBC_{combination\ b}}{MBC_{alone\ b}}$$

Interpretasi hasil $\sum FBCI$ sama halnya interpretasi $\sum FICI$ Apabila hasilnya bernilai <0,5 maka kombinasi bersifat sinergis, jika bernilai 0,5-4,0 maka kombinasi bersifat aditif dan jika bernilai >4,0 maka kombinasi dikatakan bersifat antagonis.

Analisa Data Statistik

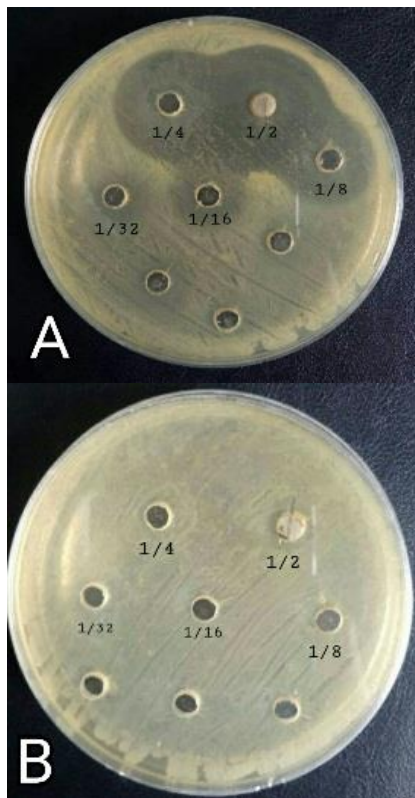
Hasil ZOI tunggal dan kombinasi diukur menggunakan mistar dengan ketelitian 1 mm, untuk mendapatkan rerata dan standar deviasi menggunakan aplikasi *Microsoft Excel* 2013. Uji statistik normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*, data menunjukkan terdistribusi normal

($p < 0,5$). Sehingga analisis data menggunakan *Independent T-Test*. Tujuannya untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antara ADT dengan ADT+HDT dan ADT+HDR; dan ADR dengan ADR+HDT dan ADR+HDR. Sedangkan uji KHM dan KBM kombinasi penilaian menggunakan rumus FICI dan FBCI pada KBM, dan diinterpretasikan sesuai rumus tersebut.

HASIL

Hasil Uji Zona Inhibisi Tunggal Lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil rerata dan standart deviasi ZOI ekstrak metanolik Lengkuas tunggal beserta konsentrasinya terdapat pada **tabel 2** dan **gambar 1**



Gambar 1. Hasil uji ZOI pada *S.aureus* dan *E.coli*.

Berdasarkan gambar tersebut didapatkan pada *S.aureus* *clear zone* terdapat pada dilusi 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dan 1/32. Hasil uji ZOI pada *E.coli* tidak didapatkan *clear zone*. Dilihat dari **gambar 1** dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanolik lengkuas lebih efektif terhadap *S.aureus*.

Tabel 2. Hasil Rerata dan Standart Deviasi Uji ZOI tunggal lengkuas terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Dilusi (Konsentrasi)	ZOI Lengkuas (mm)	
	$\bar{X} \pm SD$	
	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>
1/2 (0,5 mg/ml)	24,00 $\pm$ 0	0
1/4 (0,25 mg/ml)	22,00 $\pm$ 0	0
1/8 (0,125 mg/ml)	18,00 $\pm$ 0	0
1/16 (0,062 mg/ml)	14,00 $\pm$ 0	0
1/32 (0,013 mg/ml)	10,00 $\pm$ 0	0

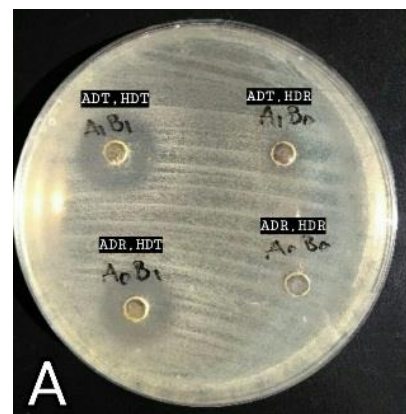
Keterangan: Tingkat kekuatan daya antibakteri 10-22 mm, daya hambat kuat; 5-10 mm, daya hambat sedang; <6 mm; daya hambat lemah.

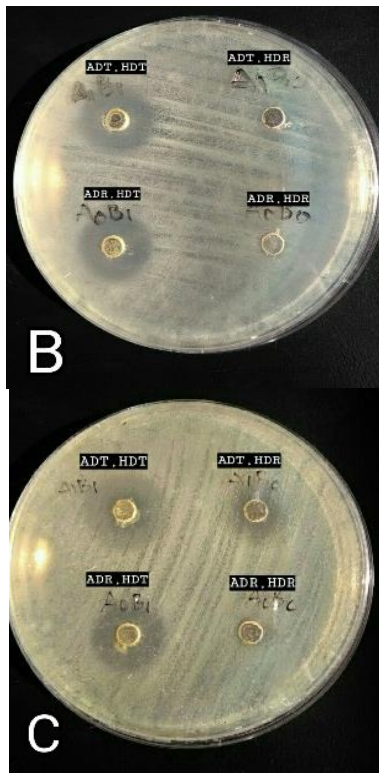
Dari **tabel 2** didapatkan hasil bahwa ekstrak metanolik lengkuas (*Alpinia galanga*) lebih sensitif terhadap *S.aureus* dibandingkan dengan *E.coli*. Dilihat dari hasil rata-rata dari uji ZOI tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin besar konsentrasi maka akan semakin besar daya hambat yang ditimbulkan.

Hasil rerata dan standar deviasi antibiotik tunggal terhadap *S.aureus* pada konsentrasi 0,5 mg/ml yaitu; AMX 21,67 $\pm$ 1,52, CLO 32,67 $\pm$ 1,15 dan COT 25,00 $\pm$ 3,00¹⁴. Sedangkan terhadap *E.coli* pada konsentrasi 0,5 mg/ml yaitu; AMX 16,67 $\pm$ 0,57, CLO 34,67 $\pm$ 1,15 dan COT 20,67 $\pm$ 0,57¹⁴.

Hasil Uji ZOI kombinasi Lengkuas dengan AMX, CLO atau COT terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

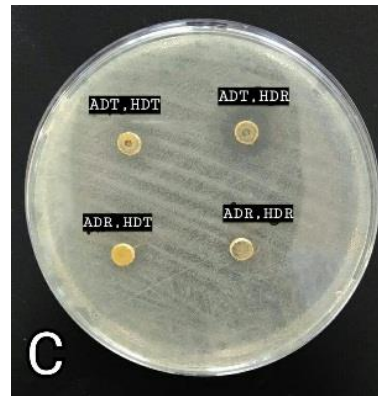
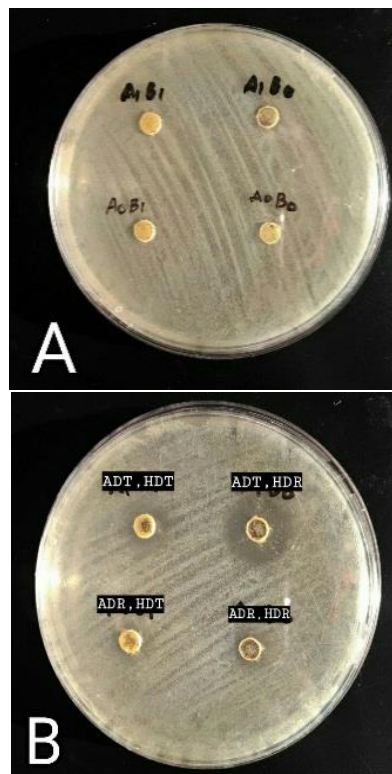
Hasil rerata dan standart deviasi pada ZOI kombinasi ekstrak lengkuas dengan Amoxicillin, Chloramphenicol dan Cotrimoxazole terdapat pada **gambar 2.1, gambar 2.2, tabel 3.1 dan tabel 3.2**. Sedangkan hasil analisis data ZOI tunggal dan kombinasi terdapat pada **tabel 3.3**.





Gambar 2.1 ZOI kombinasi terhadap *S.aureus*, Kombinasi L dan AM X (a); Kombinasi L dan CLO (b); Kombinasi L dan COT (c).

Pada **gambar 2.1** hasil ZOI kombinasi terhadap *S.aureus* pada kombinasi dengan AM X dan CLO terdapat *clear zone* pada dosis ADT+HDT dan ADR+HDT. Kombinasi dengan COT terdapat *clear zone* pada dosis ADT+HDT, ADT+HDR dan ADR+HDT.



Gambar 2.2 ZOI kombinasi terhadap *E.coli*, kombinasi L dan AM X (a); kombinasi L dan CLO (b); kombinasi L dan COT (c)

Pada **gambar 2.2** hasil ZOI kombinasi terhadap *E.coli* pada kombinasi dengan AM X terdapat *clear zone* pada dosis ADT+HDR. Kombinasi dengan CLO dan COT terdapat *clear zone* pada dosis ADT+HDT dan ADT+HDR.

Tabel 3.1 Hasil Rata-rata dan Standart Deviasi Uji ZOI kombinasi Lengkuas dan Beberapa Antibiotik terhadap *S.aureus*

Model Kombinasi	Dosis	L+AM X x±SD	L+CLO x±SD	L+COT x±SD
ADT+HDT		19,67± 0,57	20,00± 3,60	19,67± 3,78
ADT+HDR		0	0	12,67± 3,78
ADR+HDT		19,67 ±2,31	19,33±3,2 1	18,67± 1,52
ADR+HDR		0	0	0

Keterangan: ADT, Antibiotik Dosis Tinggi; ADR, Antibiotik Dosis Rendah; HDT, Herbal Dosis Tinggi; HDR, Herbal Dosis Rendah; 0, tidak ada hasil

Tabel 3.2 Hasil Rata-rata dan Standart Deviasi Uji ZOI kombinasi Lengkuas dan Beberapa Antibiotik terhadap *E.coli*

Model dosis kombinasi	L+AM X x±SD	L+CLO x±SD	L+COT x±SD
ADT+HDT	0	10,33±0,57	5,00 ±4,35
ADT+HDR	2,33 ±4,04	12,67±3,78	12,33±1,52
ADR+HDT	0	0	0
ADR+HDR	0	0	0

Keterangan: ADT, Antibiotik Dosis Tinggi; ADR, Antibiotik Dosis Rendah; HDT, Herbal Dosis Tinggi; HDR, Herbal Dosis Rendah; 0, tidak ada hasil

Berdasarkan **tabel 3.1 dan 3.2** hasil ZOI kombinasi dengan AM X, CLO dan COT pada dosis ADT+HDT dan ADR+HDT, selain itu hasil ZOI kombinasi dengan COT juga terdapat pada dosis

ADT+HDR terhadap *S.aureus*. Sedangkan hasil ZOI kombinasi terhadap *E.coli*, terdapat pada dosis

ADT+HDT dan ADT+HDR pada semua kombinasi, kecuali kombinasi dengan AMX hasil ZOI kombinasi hanya pada dosis ADT+HDR. Kemudian hasil ZOI kombinasi tersebut dibandingkan dengan hasil ZOI tunggal dari antibiotik. Hasil perbandingan pada **tabel 3.3** dan **tabel 3.4**

Tabel 3.3 Analisis Data Hasil ZOI Tunggal dan Kombinasi terhadap *S.aureus*

	<i>S.aureus</i>	
	L HDT	L HDR
AMX ADT	↑	↓
AMX ADR	↑	=
CLO ADT	=	↑
CLO ADR	=	↓
COT ADT	=	=
COT ADR	↑	=

Keterangan : AMX, Amoxicillin; CLO, Chloramphenicol; COT, Cotrimoxazole; L, Lengkuas; ADT, Antibiotik Dosis Tinggi; ADR, Antibiotik Dosis Rendah; ↑ Peningkatan; ↓, penurunan; =, tidak ada perubahan

Tabel 3.4 Analisis Data Hasil ZOI Tunggal dan Kombinasi terhadap Bakteri *E.coli*

	<i>E.coli</i>	
	L HDT	L HDR
AMX ADT	↓	↓
AMX ADR	=	=
CLO ADT	=	=
CLO ADR	=	=
COT ADT	↓	=
COT ADR	=	=

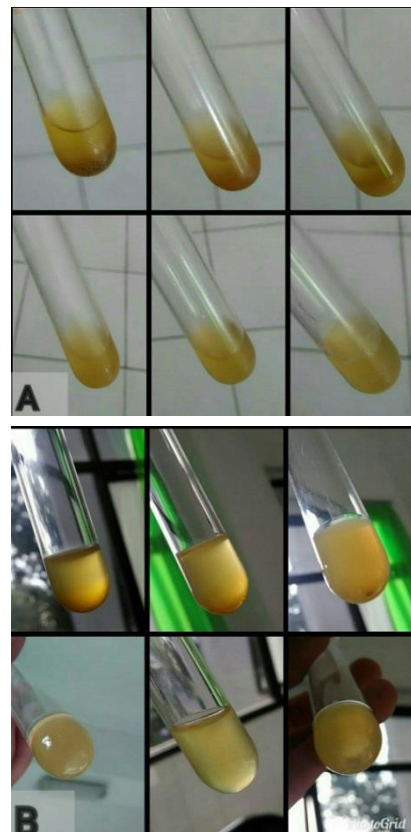
Keterangan : AMX, Amoxicillin; CLO, Chloramphenicol; COT, Cotrimoxazole; L, Lengkuas; ADT, Antibiotik Dosis Tinggi; ADR, Antibiotik Dosis Rendah; ↑ Peningkatan; ↓, penurunan; =, tidak ada perubahan

Pada **tabel 3.3** dan **tabel 3.4** hasil ZOI tunggal antibiotik dosis tinggi dan dosis rendah yang dibandingkan dengan kombinasi Lengkuas dosis tinggi dan dosis rendah. Didapatkan hasil pada *S.aureus*; kombinasi Lengkuas dosis tinggi dengan AMX dosis tinggi dan rendah terjadi peningkatan, tetapi kombinasi Lengkuas dosis rendah dengan AMX dosis tinggi terjadi penurunan. Kombinasi

Lengkuas dosis rendah dengan CLO dosis tinggi terjadi peningkatan, sedangkan kombinasi dengan CLO dosis rendah terjadi penurunan. Kombinasi COT dosis rendah dengan Lengkuas dosis tinggi terjadi peningkatan yang signifikan. Hasil pada *E.coli*, kombinasi AMX dosis tinggi dan rendah dengan Lengkuas dosis tinggi dan rendah terjadi penurunan. Pada kombinasi COT dosis tinggi dengan Lengkuas dosis tinggi terjadi penurunan. Pada kombinasi yang lain tidak terjadi perubahan.

Hasil Uji KHM Tunggal dan Kombinasi Lengkuas dan AMX, CLO, COT

Hasil KHM terdapat pada **tabel 4.1** Interpretasi uji KHM yaitu dengan melihat ada atau tidak endapan putih atau endapan bakteri pada dasar tabung reaksi. Hasil uji KHM yaitu dilusi atau konsentrasi sebelum ada endapan putih atau endapan bakteri tersebut. Nilai Kadar Hambat Minimum lengkuas terhadap *S.aureus* adalah konsentrasi 0,0625mg/ml, sedangkan terhadap *E.coli* adalah 0,125mg/ml, yang berarti dengan konsentrasi rendah 0,0625mg/ml ekstrak metanolik lengkuas sudah dapat menghambat bakteri pada *S.aureus*, sedangkan pada *E.coli* dibutuhkan dilusi lebih besar untuk dapat menghambat bakteri yaitu pada konsentrasi 0,125mg/ml.



Gambar 3 Hasil KHM tunggal lengkuas terhadap *S.aureus* (a) dan pada *E.coli* (b)

Pada **gambar 3** adalah hasil dari uji KHM tunggal ekstrak metanolik lengkuas. Uji KHM terhadap *S.aureus* didapatkan endapan putih atau

endapan bakteri pada konsentrasi 0,031 mg/ml dan terhadap *E.coli* pada konsentrasi 0,062 mg/ml. Penilaian KHM ialah konsentrasi sebelum didapatkan endapan.

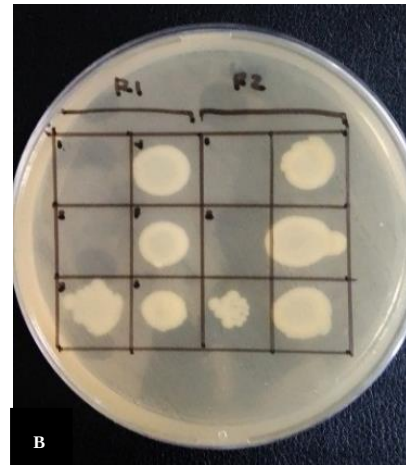
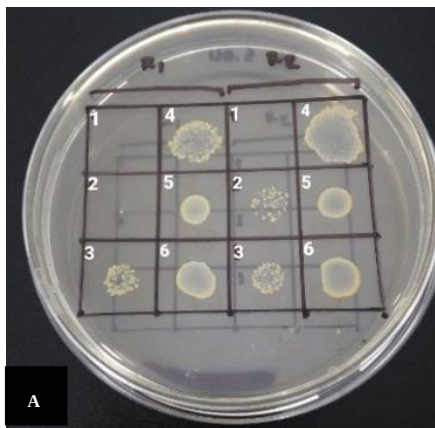
Untuk Kadar Hambat Minimum (KHM) kombinasi menggabungkan hasil dari KHM tunggal lengkuas dan antibiotik. Hasil KHM tunggal lengkuas yang dipakai dalam uji kombinasi yaitu pada konsentrasi 0,25 mg/ml terhadap *S.aureus* dan konsentrasi 0,5 mg/ml terhadap *E.coli*. Sedangkan hasil KHM tunggal antibiotik yaitu pada antibiotik AMX dan CLO terdapat pada dilusi 0,0625 mg/ml dan pada antibiotik COT terdapat pada dilusi 0,007 mg/ml terhadap *E.coli*. Sedangkan terhadap *S.aureus*, antibiotik AMX, CLO dan COT terdapat pada dilusi 0,0625 mg/ml.

Hasil KHM kombinasi diinterpretasikan sama dengan KHM tunggal baik pada lengkuas maupun pada antibiotik. Hasil kombinasi lengkuas dengan AMX, CLO dan COT terdapat pada **Tabel 4.1**. Selanjutnya hasil dari KHM kombinasi tersebut dilakukan penghitungan menggunakan rumus FICI. Hasil penghitungan terdapat pada **Tabel 4.2**.

Berdasarkan hasil penghitungan FICI didapatkan kombinasi lengkuas dengan AMX atau CLO terhadap *S.aureus* dan *E.coli* memiliki nilai indeks 0,5-4,0 yang berarti bersifat aditif. Kombinasi lengkuas dengan COT pada *E.coli* memiliki nilai indeks 0,5-4,0 yaitu bersifat aditif, sedangkan pada *S.aureus* memiliki nilai indeks >4,0 sehingga bersifat antagonis

Hasil Uji KBM Tunggal dan Kombinasi Lengkuas dengan AMX, CLO, COT

Hasil uji KBM tunggal ekstrak metanolik lengkuas pada **gambar 4**, sedangkan rerata dan standart deviasi pada **tabel 5.1**.



Gambar 4 Hasil KBM tunggal ekstrak metanolik lengkuas terhadap *S.aureus* (a) dan terhadap *E.coli* (b)

Penilaian dikatakan baik apabila pada konsentrasi rendah sudah memiliki daya membunuh bakteri. Nilai hasil KBM tunggal lengkuas terhadap *S.aureus* yaitu pada konsentrasi 0,5 mg/ml dan konsentrasi 0,25 mg/ml pada *E.coli* pada **gambar 4**. Sedangkan untuk rerata dan standart deviasi pada **tabel 5.1**. Nilai hasil KBM antibiotik tunggal pada *S.aureus* yaitu pada AMX, CLO dan COT adalah 0,0156 mg/ml. Lain halnya pada *E.coli*, nilai KBM antibiotik tunggal pada AMX 0,0156 mg/ml, CLO 0,0156 mg/ml dan COT adalah 0,0019 mg/ml (**tabel 5.1**)

Nilai hasil kadar Bunuh Minimum kombinasi terdapat pada **Tabel 5.1**. Kemudian dilakukan penghitungan menggunakan rumus FBCI untuk mengetahui sifat yang dimiliki pada kombinasi (**tabel 5.2**). Dari penghitungan tersebut didapatkan pada kombinasi lengkuas dengan AMX terhadap *S.aureus* bersifat antagonis, sedangkan pada kombinasi yang lain bersifat aditif

Tabel 4.1 Hasil K H M Tunggal dan Kombinasi pada Lengkuas dan Beberapa Antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli*.

Bakteri	Dilusi	K H M Tunggal				K H M Kombinasi		
		[L]	[A M X]	[C L O]	[C O T]	[A M X & L]	[C L O & L]	[C O T & L]
<i>S. aureus</i>	1							
	½	-	-	-	-			
	¼	-	-	-	-			
	1/8	-	-	-	-			
	1/16	-	-	-	-	1/4	1/4	1/4
	1/32	+	-	-	-	-	-	+
	1/64	+	-	-	-	+	-	+
	1/128		+	+	+	+	+	+
	1/256		+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	1							
	½	-	-	-	-			
	¼	-	-	-	-			
	1/8	-	-	-	-			
	1/16	+	-	-	-	½	½	
	1/32	+	-	-	-	-	-	
	1/64	+	-	-	-	-	-	
	1/128		+	+	-	+	-	½
	1/256		+	+	-	+	+	-
	1/512		+	+	-			-
	1/1024		+	+	+			+
	1/2048		+	+	+			+

Keterangan: K H M , Kadar Hambat Minimum; [L], Lengkuas; [A M X], *Amoxicillin*; [C L O], *Chloramphenicol*; [C O T], *Cotrimoxazole*; [L & A M X], Lengkuas kombinasi *Amoxicillin*; [TL & CH L], Lengkuas kombinasi *Chloramphenicol*; [TL & C O T], Lengkuas kombinasi *Cotrimoxazole*; ¼ , Konsentrasi herbal awal dalam kombinasi terhadap *S.aureus*; ½ , Konsentrasi herbal awal dalam kombinasi terhadap *E.coli*; , Kadar Hambat Minimum yang dihasilkan; + , Adanya endapan didasar tabung; - , Tidak ditemukan endapan didasar tabung

Tabel 4.2 Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) Lengkuas dengan Antibiotik Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Bakteri	Fractional Inhibitory Concentration				Sifat	Fractional Inhibitory Concentration				Sifat	Fractional Inhibitory Concentration				Sifat
	FICI		Σ FIC	C		FICI		Σ FIC	C		FICI		Σ FIC	C	
	L	A M X				L	C L O				L	C O T			
<i>S.aureus</i>	2,0	2,0	4,0	A ditif	1,0	1,0	2,0	A ditif	4,0	4,0	8,0	A nt			
<i>E.coli</i>	1,0	1,0	2,0	A ditif	0,5	0,5	1,0	A ditif	1,0	1,0	2,0	A ditif			

Keterangan : FICI, *Fractional Inhibitory Concentration Index*; Σ FIC , *Fractional Inhibitory Concentration Total*; L , Lengkuas; A M X , *Amoxicillin*; C L O , *Chloramphenicol*; C O T , *Cotrimoxazole*; Sinergis, Nilai FIC indeks < 0,5; A ditif, Nilai FIC indeks 0,5 -4,0; Antagonis, Nilai FIC indeks > 4,0

Tabel 5.1 Hasil KBM Tunggal dan KombinasiLengkuas dan Beberapa Antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Bakteri	Dilusi	K B M Tunggal				K B M Kombinasi		
		[L]	[A M X]	[C L O]	[C O T]	[A M X & L]	[C L O & L]	[C O T & L]
<i>S. aureus</i>	1							
	½	-	-	-	-			
	¼	+	-	-	-			
	1/8	+	-	+	-			
	1/16	+	-	+	+	- 1/4	- 1/4	- 1/4
	1/32	+	-	+	+	+	+	+
	1/64	+	+	+	+	+	+	+
	1/128		+	+	+	+	+	+
	1/256		+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	1							
	½	-	-	-	-			
	¼	-	-	-	-			
	1/8	+	+	-	-			
	1/16	+	+	-	-	- ½	- ½	
	1/32	+	+	-	+	-	+	
	1/64	+	+	+	+	+	+	
	1/128		+	+	+	+	+	- ½
	1/256		+	+	+	+	+	+
	1/512		+	+	+			+
	1/1024		+	+	+			+
	1/2048		+	+	+			+

Keterangan: K H M , Kadar Hambat Minimum; [L], Lengkuas; [A M X], *Amoxicillin*; [C L O], *Chloramphenicol*; [C O T], *Cotrimoxazole*; [L & A M X], Lengkuas kombinasi *Amoxicillin*; [T L & C H L], Lengkuas kombinasi *Chloramphenicol*; [T L & C O T], Lengkuas kombinasi *Cotrimoxazole*; , Kadar Bunuh Minimum yang dihasilkan; +, A danya koloni di media; -, Tidak ditemukan koloni di media; ¼ , Konsentrasi awal herbal dalam kombinasi terhadap *S.aureus*; ½ , Konsentrasi awal herbal dalam kombinasi *E.coli*

Tabel 5.2 Fractional Bactericidal Concentration Index (FBCI) Lengkuas dengan Antibiotik Terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Bakteri	Fractional Bactericidal Concentration			Sifat	Fractional Bactericidal Concentration			Sifat	Fractional Bactericidal Concentration			Sifat	
	FBC I	FBC I	Σ FBC		FBC I	FBC I	Σ FBC		FBC I	FBC I	Σ FB C		
	L	A M X			L	C L O			L	C O T			
S . a u r e u s	2,0	1,0	3,0	A d i t i f	2,0	1,0	3,0	A d i t i f	2,0	1,0	3,0	A d i t i f	
E . c o l i	1,0	4,0	5,0	A n t	2,0	2,0	4,0	A d i t i f	2,0	0,25	2,25	A d i t i f	

Keterangan: FBCI, *Fractional Bactericidal Concentration Index*; Σ FBC, *Fractional Bactericidal Concentration Total*; L, Lengkuas; A M X, *Amoxicillin*; C L O, *Chloramphenicol*; C O T, *Cotrimoxazole*; Sinergis, Nilai FBC indeks < 0,5; A ditif, Nilai FBC indeks 0,5 -4,0; A ntagonis, Nilai FBC indeks > 4,0

PEMBAHASAN

Uji ZOI, KHM, KBM Tunggal Lengkuas (*Alpinia galanga*) dan Antibiotik AMX, CLO dan COT terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Berdasarkan hasil pengujian zona inhibisi (ZOI) tunggal ekstrak metanolik lengkuas (tabel 2) didapatkan hasil bahwa ZOI pada *S.aureus* lebih besar daripada *E.coli*, dilihat dari rata-ratanya pada *S.aureus* semakin besar konsentrasinya maka *clear zone* semakin besar dan juga sebaliknya¹⁵.

Adanya Zona Inhibisi/*clear zone* yang terbentuk disebabkan karena adanya zat aktif yang bersifat sebagai antimikroba yang dikandung oleh ekstrak rimpang lengkuas. Salah satu zat aktif tersebut adalah flavonoid yang merupakan turunan dari fenol. Senyawa flavonoid memiliki kecenderungan untuk mengikat protein bakteri¹⁶. Pada kadar rendah menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein dan pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis¹⁶.

Hasil ZOI tunggal lengkuas pada *S.aureus* lebih besar dibandingkan dengan hasil ZOI pada *E.coli*. Hal ini disebabkan karena perbedaan struktur selnya. *E.coli* merupakan bakteri gram negative yang memiliki dinding sel yang lebih kompleks dibanding dengan bakteri gram positif sehingga tidak mudah ditembus atau dirusak¹⁷. Lain halnya dengan *S.aureus* yang merupakan bakteri gram positif yang mempunyai dinding sel lebih sederhana sehingga mudah untuk dirusak dan dihambat sintesa protein atau sintesa asam nukleus^{17,18}. Seperti yang tertulis sebelumnya Senyawa flavonoid bekerja secara intra sel, sehingga perbedaan kompleksitas dinding sel bakteri sangat berpengaruh pada banyaknya senyawa yang dapat menembus dinding sel.

Seperti dengan hasil ZOI, hasil uji KHM tunggal Lengkuas menurunkan nilai KHM lebih besar pada *S.aureus* dibanding *E.coli*, yang dilihat dari konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Pada *S.aureus* konsentrasi yang dibutuhkan adalah 0,0625 mg/ml sedangkan pada *E.coli* adalah 0,125 mg/ml. Semakin kecil konsentrasi maka aktivitas senyawa semakin kuat.

Hasil uji KBM dikatakan baik apabila pada dilusi rendah sudah dapat membunuh bakteri. Taslihan *et al.* (2001) menyatakan bahwa antibiotik dapat bersifat bakteriostatik atau bakteriosidal berdasarkan ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada media agar. Apabila pada media agar terdapat pertumbuhan bakteri berarti antibiotik bersifat bakteriostatik, sedangkan apabila tidak terdapat pertumbuhan bakteri maka bersifat bakteriosidal¹⁹. Hasil KBM tunggal ekstrak metanolik lengkuas terhadap *S.aureus* adalah 0,5 mg/ml dan terhadap *E.coli* adalah 0,25 mg/ml. KHM dan KBM dapat menentukan sifat suatu antibiotik, yaitu bersifat

bakteriostatik atau bakteriosidal. Dikatakan bakteriosidal apabila hasil uji KBM tidak 4 kali lebih besar dibandingkan dengan uji KHM nya²⁴.

Pada penelitian ditemukan lengkuas memiliki efek bakteriosidal pada *E.coli* dan bakteriostatik pada *S.aureus*. Komponen yang ditemukan bekerja sebagai bakteriosidal tersebut adalah minyak atsiri, flavonoid dan fenol^{9,10,11}, sedangkan metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini lebih menargetkan senyawa-senyawa yang polar, sedangkan minyak atsiri senyawa non polar. Sehingga yang terekstraksi adalah senyawa polar dan dapat berakibat efek antibakteri tidak terlihat.

Uji ZOI, KHM dan KBM Kombinasi Lengkuas dengan Beberapa Antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli*

Hasil ZOI kombinasi yang dibandingkan dengan ZOI tunggal antibiotik dosis tinggi (ADT) dan dosis rendah (ADR), didapatkan hasil pada *S.aureus*; kombinasi Lengkuas dosis tinggi dengan AMX dosis tinggi dan rendah bersifat sinergis, yang berarti ketika kedua obat digabungkan menghasilkan efek antibakteri yang lebih besar dibandingkan diberikan secara tunggal²⁰. Tetapi kombinasi Lengkuas dosis rendah dengan AMX dosis tinggi bersifat antagonis, yang berarti jika dua obat dikombinasikan akan menghasilkan efek yang lebih kecil dari tunggal²¹. Kombinasi lengkuas dosis rendah dengan CLO dosis tinggi bersifat sinergis (efek antibakteri lebih besar dari tunggal), sedangkan kombinasi dengan CLO dosis rendah bersifat antagonis (efek antibakteri lebih kecil dari tunggal). Kombinasi COT dosis rendah dengan Lengkuas dosis tinggi bersifat sinergis.

Hasil pada *E.coli*, kombinasi AMX dosis tinggi dan rendah dengan Lengkuas dosis tinggi dan rendah bersifat antagonis, serta pada kombinasi COT dosis tinggi dengan Lengkuas dosis tinggi juga bersifat antagonis. Pada kombinasi yang lain bersifat aditif, yang berarti ketika kedua obat digabungkan tidak saling mempengaruhi²¹. Hasil interaksi yang didapatkan dengan uji AZDAST ditemukan perbedaan dengan metode checkbord (FICI dan FBICI). Adanya perbedaan sifat yang dihasilkan dari ZOI dengan FICI diduga karena kedua uji dilakukan dengan jenis media yang berbeda yaitu padat dan cair, sehingga difusinya akan berbeda dan mempengaruhi efektivitas dari antibakterinya²³.

Hasil KHM kombinasi ekstrak metanolik lengkuas dengan beberapa antibiotik terhadap *S.aureus* dan *E.coli* dilakukan penghitungan menggunakan rumus *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI). Berdasarkan penghitungan tersebut diketahui bahwa kombinasi ekstrak metanolik lengkuas dengan AMX atau CLO terhadap *S.aureus* dan kombinasi AMX, CLO atau COT terhadap *E.coli* bersifat aditif, sedangkan

kombinasi COT terhadap *S.aureus* bersifat antagonis.

Sifat antagonis yang dihasilkan dari kombinasi COT dengan lengkuas terhadap *S.aureus* tersebut kemungkinan karena perubahan sifat dari cotrimoxazole menjadi bakteristatik, sehingga jika dikombinasikan dengan lengkuas yang mempunyai senyawa bersifat bakterisidal^{9,10,11,29}, akan menghasilkan sifat antagonis¹⁸. Sifat bakteristatik dan bakterisidal bisa ditentukan dengan konsentrasi senyawa tersebut dalam bekerja terhadap bakteri. Hal ini dilaporkan di beberapa jurnal pada antibiotik Chloramphenicol, dimana pada konsentrasi dosis tinggi akan bersifat bakterisidal, sedangkan pada konsentrasi dosis rendah bersifat bakteristatik²⁵. Hal ini menunjukkan bahwa Lengkuas mempengaruhi konsentrasi dari cotrimoxazole.

Penghitungan hasil Kadar Bunuh Minimum (KBM) kombinasi menggunakan *Fractional Bactericidal Concentration Index* (FBCI) diketahui bahwa kombinasi dengan AMX terhadap *E.coli* bersifat antagonis, sedangkan pada kombinasi yang lain bersifat aditif. Sifat antagonis pada kombinasi AMX terhadap *E.coli* kemungkinan terjadi karena senyawa minyak atsiri, flavonoid dan fenol pada lengkuas bekerja pada dinding sel^{26,27}, sedangkan amoxicillin juga bekerja pada dinding sel²⁸ sehingga mekanisme kerjanya pada tempat yang sama. Hal tersebut menyebabkan salah satu dari obat akan menghambat kerja dari obat yang lain. Selain itu adanya senyawa lain pada ekstrak metanolik lengkuas menyebabkan efek bakterisidalnya menghilang saat dikombinasikan, sehingga uji fitokimia dibutuhkan untuk mengetahui senyawa aktif yang mempengaruhi hilangnya efek bakterisidal pada lengkuas. Sifat aditif kemungkinan dapat terjadi karena adanya percampuran senyawa pada ekstrak metanolik lengkuas yang digunakan. Oleh sebab itu diperlukan pengujian fraksinasi pada penelitian ini untuk mengetahui senyawa pada *pure compound* dan pada pencampuran, kemungkinan jika menggunakan *pure compound* lengkuas akan menghasilkan sifat yang berbeda.

KESIMPULAN

- Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan :
1. Pemberian ekstrak metanolik Lengkuas (*Alpinia galanga*) memiliki zona inhibisi lebih besar pada *Staphylococcus aureus* dibandingkan pada *Escherichia coli*
 2. Pemberian ekstrak metanolik Lengkuas (*Alpinia galanga*) yang dikombinasikan dengan Amoxicillin, Chloramphenicol atau Cotrimoxazole terhadap *Staphylococcus aureus* memiliki Zona Inhibisi (ZOI) bersifat sinergis, sedangkan yang dikombinasikan dengan Amoxicillin, Chloramphenicol atau

Cotrimoxazole terhadap *Escherichia coli* bersifat aditif.

3. Pemberian ekstrak metanolik lengkuas (*Alpinia galanga*) yang dikombinasikan dengan Amoxicillin, Chloramphenicol atau Cotrimoxazole terhadap *Escherichia coli* serta yang dikombinasikan dengan Amoxicillin atau Chloramphenicol terhadap *Staphylococcus aureus* memiliki Kadar Hambat Minimum (KHM) bersifat aditif, sedangkan yang dikombinasikan dengan Cotrimoxazole terhadap *Staphylococcus aureus* memiliki sifat antagonis
4. Pemberian ekstrak metanolik lengkuas (*Alpinia galanga*) yang dikombinasikan dengan Amoxicillin terhadap *Escherichia coli* memiliki Kadar Bunuh Minimum (KBM) bersifat antagonis, sedangkan pada kombinasi yang lain bersifat aditif.

SARAN

Adapun saran yang dapat peneliti ajukan

1. Melakukan uji fitokimia pada Lengkuas (*Alpinia galanga*) untuk mengidentifikasi jenis senyawa aktif yang terkandung didalamnya.
2. Melakukan uji fraksinasi pada Lengkuas (*Alpinia galanga*) untuk mengetahui senyawa pada *pure compound* dan pada hasil ekstraksi.
3. Melakukan uji ZOI kombinasi ekstrak metanolik lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan Amoxicillin, Chloramphenicol atau Cotrimoxazole terhadap *Staphylococcus aureus* atau *Escherichia coli* menggunakan dosis tengah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan Orangtua Mahasiswa (IOM) selaku pemberi dana pada penelitian ini dan kepada dr. Rahma Triliana, S.Ked, M.Kes, PhD selaku reviewer jurnal.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. World Health Statistics 2014. Di akses pada November 2018 dari http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/en/
2. Riskesdas. 2013. Diakses pada tanggal 15 November 2018 di <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf>
3. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States. 2013. Diakses pada 15 November 2018 dari

- <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>.
4. Farida, H., Herawati., Haosari, M M., Notoadmodjo, H., Hardian. Penggunaan Antibiotik Secara Bijak Untuk Mengurangi Resistensi Antibiotik, Studi Intervensi di Bagian Kesehatan Anak RS Dr. Kariadi. Sari pediatri. 2008
 5. Kemenkes RI, Penggunaan Antibiotik Bijak dan Rasional Kurangi Beban Penyakit Infeksi. 2015. Diakses pada 25 Februari 2019 dari <http://www.depkes.go.id/article/print/1508110-0001/penggunaan-antibiotik-bijak-dan-rasional-kurangi-beban-penyakit-infeksi.html>
 6. Rosalina D, Martodihardjo S, Listiawan M Y. Staphylococcus aureus sebagai penyebab tersering infeksi sekunder pada semua erosi kulit dermatosis vesikobulosa. BIKKK. 2010
 7. Djie-Maletz, A., Reither, K., Danour, S., Anyidoho, L., Saad, E., Danikuu, F., Ignatius, R. High rate of resistance to locally used antibiotics among enteric bacteria from children in Northern Ghana. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 61(6), 1315–1318. doi:10.1093/jac/dkn108. 2008
 8. Elaine J., Betoni C., Mantovani R.P., Barbosa L.N., Claudio L., Stasi D. and Junior A.F., Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on Staphylococcus aureus diseases, **Antimicrobial Drugs and Plant Synergism**, 101, 387–390.2006
 9. Bisset, N.G and M.W ichtl. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals Second Edition. Germany: Medpharm Scientific Publishers.2001
 10. Mutschler, E., Dinamika Obat Buku Ajar Farmakologi Dan Toksikologi Edisi Kelima. Bandung: Penerbit ITB.1991
 11. Yuharmen, Y. Eryanti dan Nurbalatif. Uji Aktifitas Antimikroba Minyak Atsiri Dan Ekstrak Metanol Lengkuas (*Alpinia galanga*).Riau:Jurusan Kimia. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau. 2002
 12. Sumayani., Khusdarwati., R., dan Cahyoko, Y. Daya Antibakteri Perasan Rimpang Lengkuas (*Alpinia Galanga*) Dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Pertumbuhan *Aeromonas Hydrophila* Secara In Vitro. Berkala Ilmiah Perikanan.2008
 13. Subroto, M, Ahkam,. Ramuan Herbal untuk Diabetes Melitus. Jakarta: Penebar Swadaya.2006
 14. Anggraeni, A.D., Efek Kombinasi Ekstrak Zingiber Zerumbet L. Dengan Amoxicillin, Kloramfenicol dan Kotrimoksazol terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Malang: Fakultas kedokteran Universitas Islam Malang.2018
 15. Brooks, G., et.al. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 26th ed. New York: McGraw-Hill Medical.2012
 16. Robinson,T.,Kandungan Organik Tumbuhan Obat Tinggi, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung:ITB.1991
 17. Tortora, G. J., Frunke, B. L. dan Case, C. L. *Microbiology: An Introduction*. 10th ed. California: Benjamin & Cummings.2013
 18. Jawetz, E, J. melnick, et al. *Jawetz, melnick & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.2005
 19. Taslihan, A., S.M. Astuti, E.M. Nur dan Zari'ah..Petunjuk Umum Cara Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Dari Air, Udang dan Ikan Di Air Payau. Jepara:Balai Budidaya Air Payau Jepara. 2001
 20. Gal K.,Combined antibiotic therapy., **Canadian Medical Association journal**, 93, 844–847.1965
 21. Fradgley, S.Interaksi Obat dalam Aslam, M., Tan., C. K., dan Prayitno, A., Farmasi Klinis. Jakarta: PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia.2003
 22. Wattimena. Farmakodinamik dan Terapi antibiotic. Yogyakarta: Gajah Mada University Press. 1991
 23. Cheung AL., Fieschetti VA.,Variation in the Expression of Cell Wall Proteins of Staphylococcus aureus Grown on Solid and Liquid Media. NCBI.1988
 24. Goins M.,Minimum Inhibitory (MIC) and Minimum Bactericidal concentration (MBC) Evaluation AS R&D Tools.2017
 25. Neal, M.J. *At a Glance Farmakologi Medis Edisi Kelima*. Jakarta : Penerbit Erlangga.2006
 26. Kurniawan, B., Aryana, W.F.Binahong (*Cassia alata*L) as Inhibitor of *Escherichia coli* Growth,*Majority*.4(4): 100-104.2015
 27. Nogrady, T., Kimia Medisinal: Pendekatan Secara Biokimia penerjemah:Rasyid R, Musadad A, terjemahan dari *Medicinal Chemistry* ITB:Bandung.1992
 28. Kaur, S. P., Rao, R., & Nanda, S. AMOXICILLIN : A BROAD SPECTRUM ANTIBIOTIC,*International Jurnal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciens*.3(3).ISSN- 0975-149. 2011
 29. Pratiwi, I. Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Daun *Acalypha indica* Linn.terhadap Bakteri *Salmonella choleraesuis* dan *Salmonella typhimurium*, Surakarta. Jurusan Biologi Universitas Sebelas Maret Surakarta. 2009
- Diakses: <https://www.digilib.uns.ac.id> 01 November 2018