

**EFEK KOMBINASI SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* Ness) DENGAN
ANTIBIOTIK AMOXICILLIN, CHLORAMPHENICOL, COTRIMOXAZOLE
TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *S. aureus* DAN *E. coli* SECARA *IN VITRO***

Ainia Taufiq, Rio Risandiansyah, Zainul Fadli
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang
Email: ainia.taufiq@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Antibiotics were widely used to cure with infectious diseases, but many people use antibiotics inappropriately, such as not complete and antibiotic use without a prescription, so that the number of resistance increases. To overcome this, another alternative is needed to cure with infectious diseases, namely by combining antibiotics with herbs. This study was conducted with the aim to determine the effect of the combination of sambiloto extract with antibiotic AMX, CHL and COT on *S. aureus* and *E. coli* bacteria.

Method: The ZOI test was carried out using the AZDAST method with well modification. Observation of ZOI results was carried out by measuring the diameter of the clear zone. ZOI was tested statistically using Kolmogorov-Smirnov, then non-parametric tests using Mann-Whitney were performed. The Minimum Inhibitory Test (MIC) was carried out by microdilution using 96-well plates and macrodilution using a test tube. Microdilution test was observed using a spectrophotometer, while the macrodilution test observed turbidity and the presence of white deposits on the bottom of the test tube. The Minimum Bactericidal Concentration Test (MBC) is a continuation of the MIC test by looking at bacterial growth in agar media. Combined interactions in the MIC and MBC tests are calculated using the Checkerboard assay.

Results and Discussion: The combination of sambiloto extract with AMX, CHL, and COT against *S. aureus* bacteria is additive in the ZOI test. Whereas in the AMX combination of *E. coli* bacteria, smaller ZOI diameters were obtained, but the statistical test did not show a significant difference. The KBM test cannot be evaluated because it is outside the dose tested.

Conclusion: The combination of sambiloto extract with AMX, CHL and COT is additive in the ZOI and MIC tests. However, in these combinations the value of MBC cannot be evaluated because it is outside the test dose.

Keywords: Sambiloto, Amoxicillin, Chloramphenicol, Cotrimoxazole, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Combination of Herbal Antibiotics

PENDAHULUAN

Antibiotik merupakan zat-zat kimia yang dapat membunuh dan menghambat perkembangan bakteri. Antibiotik dihasilkan oleh mikroorganisme (khususnya oleh fungi) atau dihasilkan secara sintetik. Umumnya antibiotik banyak digunakan masyarakat untuk menangani penyakit infeksi, namun saat ini masyarakat menggunakan antibiotik dengan tidak tepat yang mana hal tersebut akan menyebabkan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik¹.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Antimicrobial Resistant in Indonesia (AMRIN-Study), dari 2494 individu di masyarakat, 43% *E. coli* resisten terhadap beberapa jenis antibakteri yaitu ampicilin (34%), kotrimoksazol (29%) dan kloramfenikol (25%). Untuk hasil penelitian yang dilakukan pada 781 pasien di rumah sakit didapatkan hasil 81% *E. coli* resisten terhadap beberapa antibakteri yaitu ampicilin (73%), kotrimoksazol (56%), kloramfenikol (43%), siprofloksasin (22%) dan gentamicin (18%). Sedangkan pada bakteri *S. aureus* resisten terhadap antibiotik metisilin dan golongan beta-laktam seperti sefalosporin, penisilin, karbapenem dan monobaktam².

Pada tahun 2015, WHO mengeluarkan rencana aksi global tentang resistensi antibiotik dimana salah satu tujuannya adalah untuk mengoptimalkan penggunaan obat-obatan antibiotik³. Optimalisasi penggunaan antibiotik dapat dilakukan dengan cara memberikan terapi kombinasi antibiotik dengan herbal, yang mana hal tersebut dapat memperluas spektrum antibakteri, mencegah munculnya mutan yang resisten dan meminimalisasi toksisitas⁴. Kombinasi antibiotik dengan herbal telah dilakukan pada beberapa penelitian, salah satunya oleh Choirunnisa dan Sutjiatmo (2017), yang melakukan pengujian kombinasi ekstrak etanol herba cecendet dengan antibiotik ampicilin/tetrasiklin memberikan efek sinergis atau aditif terhadap bakteri *S. aureus* dan *K. pneumoniae*⁵.

Sambiloto adalah tanaman obat tradisional yang diketahui memiliki komponen aktif sebagai antibakteri. Salah satu senyawa aktif sebagai antibakteri yaitu saponin yang bekerja dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel pada bakteri⁶. Pada penelitian sebelumnya telah menjelaskan bahwa tanaman sambiloto ini memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*⁷.

Kombinasi sambiloto dengan antibiotik belum pernah dilakukan sebelumnya. Komponen senyawa aktif dari sambiloto, seperti terpen/steroid dan saponin dapat berinteraksi dengan antibiotik yang bekerja pada target yang sama seperti amoxicillin atau antibiotik yang bekerja pada target yang berbeda, seperti chloramphenicol (ribosom

50s), atau cotrimoxazole (*folic acid*)⁵. Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian mengenai aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak sambiloto dengan antibiotik amoxicillin, chloramphenicol, dan cotrimoxazole terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* perlu dilakukan.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan maret 2018 sampai dengan September 2018 di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Pembuatan Ekstrak Sambiloto

Pembuatan ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata*) dilakukan dengan metode maserasi, diawali dengan mempersiapkan simplisia herbal sambiloto yang didapatkan dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT). Simplisia ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak 20 g dan dicampurkan dengan pelarut methanol 96% sebanyak 200 ml untuk direndam didalam Erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil lalu dimasukkan dalam shaker water bath dan di biarkan selama 24 jam. Setelah itu hasil ekstrak disaring dengan vacuum buchner dan di evaporasi pada suhu 45°C. Selanjutnya ekstrak di keringkan dalam oven pada suhu 60°C. Bila ekstrak telah kering dilarutkan kembali dengan metanol menjadi 1 mg/ml.

Pembuatan Larutan Antibiotik

Amoxicillin (AMX)

Pembuatan larutan amoxicillin dilakukan dengan menyiapkan serbuk vial amoxicillin yang didapatkan di apotek. Serbuk vial tersebut dilarutkan dengan menggunakan aquades steril hingga mencapai konsentrasi 1 mg/ml.

Chloramphenicol (CHL)

Kapsul chloramphenicol yang didapatkan dari apotek dipersiapkan. Kemudian kapsul dibuka dan serbuk chloramphenicol tersebut dilarutkan dengan aquades steril hingga didapatkan konsentrasi 1 mg/ml.

Cotrimoxazole (COT)

Tablet cotrimoxazole yang didapatkan di apotek dipersiapkan kemudian dihaluskan menggunakan mortar. Serbuk cotrimoxazole yang telah halus dilarutkan dengan aquades steril hingga didapatkan konsentrasi 1 mg/ml.

Preparasi Sampel Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Pada penelitian ini digunakan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang didapatkan dari Laboratorium Terpadu Universitas Islam Malang. Bakteri tersebut dibiakkan pada media padat (*Nutrient Agar*) selama 24 jam. Kemudian dilakukan

pembuatan bakteri pada media cair (*Nutrient Broth*) menggunakan metode *McFarland* untuk mendapatkan bakteri 10^8 CFU/ml. setelah didapatkan bakteri 10^8 CFU/ml, dilakukan pembuatan bakteri 10^7 CFU/ml dengan cara menambahkan 9 ml NaCl pada 1ml bakteri 10^8 CFU/ml.

Pengukuran *Zone of Inhibition* (ZOI)

Uji Zona Hambat dilakukan dengan metode AZDAST modifikasi sumuran dan metode Kirby-bauer. Metode AZDAST dilakukan untuk uji kombinasi sedangkan metode Kirby-bauer dilakukan untuk uji tunggal. Kekuatan daya antibakteri menurut Davis dan Stout (1971) yaitu bila diameter hambat ≤ 5 mm maka dikatakan daya antibakteri tersebut lemah, bila diameter hambat 5-10 mm maka dikatakan daya antibakteri tersebut sedang, bila diameter hambat 10-20 mm maka dikatakan daya antibakteri tersebut kuat, dan bila diameter hambat >20 mm maka dikatakan daya antibakteri tersebut sangat kuat⁸.

Tahap untuk melakukan uji ZOI yaitu dengan dengan mempersiapkan biakan agar yang telah diinokulasi bakteri *E.coli* dan *S.aureus* dengan pola *lawn* pada seluruh permukaan media agar, ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness), dan antibiotik *amoxicillin*, *chloramphenicol*, serta *cotrimoxazole*. Setelah itu dibuat lubang sumuran dengan menggunakan *cork borer* berukuran 6 mm. Kemudian pada lubang sumuran diberi tetesan bahan uji baik secara tunggal maupun kombinasi dengan volume 30 μ l. Pada uji kombinasi, volume tetesan bahan uji antibiotik dan ekstrak sambiloto dimasukkan pada lubang sumuran dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Uji ZOI kombinasi dilakukan dengan 2 dosis yang berbeda pada antibiotik dan ekstrak sambiloto. Dosis pertama adalah antibiotik dosis tinggi (ADT) dan herbal dosis tinggi (HDT), yakni dosis yang memberikan hasil ZOI tunggal >10 mm, sedangkan dosis yang kedua adalah antibiotik dosis rendah (ADR) dan herbal dosis rendah (HDR) yakni dosis yang memberikan hasil ZOI tunggal <8 mm.

Dosis ADT yang digunakan untuk uji kombinasi terhadap bakteri *S. aureus* yaitu pada AMX sebesar 0,125 mg/ml, CHL sebesar 0,06 mg/ml, COT sebesar 0,25 mg/ml. Sedangkan dosis ADR pada AMX sebesar 0,03 mg/ml, CHL sebesar 0,01mg/ml, dan COT sebesar 0,06 mg/ml. Dosis HDT yang digunakan untuk uji kombinasi terhadap bakteri *S. aureus* yaitu 0,5 mg/ml dan HDR sebesar 0,25 mg/ml.

Dosis ADT yang digunakan untuk uji kombinasi terhadap bakteri *E. coli* yaitu pada AMX sebesar 0,125 mg/ml, CHL sebesar 0,125 mg/ml, COT sebesar 0,25 mg/ml. Sedangkan dosis ADR pada AMX sebesar 0,03 mg/ml, CHL sebesar 0,03 mg/ml, dan COT sebesar 0,06 mg/ml. Dosis HDT yang digunakan untuk uji kombinasi terhadap

bakteri *E. coli* yaitu 0,5mg/ml dan HDR sebesar 0,25 mg/ml.

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.

Pengukuran Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Perhitungan FICI

Uji kadar hambat minimum dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dari antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah semalam inkubasi⁹. Pada uji ini dilakukan dengan dua cara yaitu dengan mikrodilusi menggunakan 96 well-plate dan makrodilusi menggunakan tabung reaksi.

Untuk Uji KHM mikrodilusi dilakukan dengan cara menyiapkan 96-well-plate yang akan diisi dengan antibiotik, *Nutrient Broth* (NB), dan bakteri. Untuk pembuatan kontrol negatif diisi dengan aquades, NB, dan NaCl. Sedangkan untuk kontrol positif sama dengan kontrol negatif hanya saja ditambahkan bakteri. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.

Untuk Uji KHM makrodilusi dilakukan dengan cara menyiapkan tabung reaksi yang akan diisi dengan herbal, NB, dan bakteri untuk uji tunggal herbal. Sedangkan, untuk uji kombinasi pada tabung reaksi diisi dengan antibiotik, herbal, NB, dan bakteri dengan kepadatan 10^7 CFU/ml. Tabung reaksi yang telah terisi bahan uji diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Pengamatan hasil Uji KHM makrodilusi dilihat pada perubahan warna dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok kontrol positif memiliki hasil warna yang keruh dan terdapat endapan putih dibawah tabung reaksi sedangkan untuk kelompok kontrol negatif memiliki hasil warna yang jernih.

Dosis awal antibiotik dan herbal yang digunakan untuk uji KHM kombinasi yaitu pada *S. aureus* dosis AMX, CHL, dan COT sebesar 0,06 mg/ml. Pada *E. coli* dosis awal sebesar AMX dan CHL 0,06 mg/ml dan COT sebesar 0,007 mg/ml. dosis awal herbal yang digunakan untuk kombinasi KHM pada *S. aureus* sebesar 0,25 mg/ml dan pada *E. coli* sebesar 2 mg/ml.

Penilaian uji KHM kombinasi menggunakan *Checkerboard assay* dengan rumus:

$$\Sigma \text{FICI} = \frac{\text{KHM kombinasi a}}{\text{KHM tunggal a}} + \frac{\text{KHM kombinasi b}}{\text{KHM tunggal b}}$$

Interpretasi hasil FIC indeks yaitu, yaitu bila FICI total bernilai $\leq 0,5$ maka dikatakan sinergis, bernilai 0,5-4 bernilai aditif, sedangkan bila >4 dikatakan antagonis¹⁰.

Pengukuran Kadar Bunuh Minimum (KBM) dan Perhitungan FBCI

Uji Kadar Bunuh Minimum dilakukan untuk melihat konsentrasi terkecil dari antibakteri yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri¹¹. Untuk melakukan uji KBM, bahan diambil dari hasil uji KHM sebelumnya. Cawan petri yang akan dituangkan media agar sebelumnya dibagi menjadi beberapa bagian dengan digambar berbentuk kotak berukuran 1,5 cm x 1,5 cm. Kemudian hasil KHM diteteskan pada cawan petri sebanyak 10 µl. Biakan yang telah dibuat diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 24-48 jam maka dapat dibaca hasilnya. Konsentrasi yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri dinyatakan sebagai KBM, yaitu konsentrasi terkecil yang mampu membunuh bakteri uji.

Penilaian uji KBM kombinasi menggunakan *Checkerboard assay* dengan rumus:

$$\Sigma \text{FBCI} = \frac{\text{KBM kombinasi a}}{\text{KBM tunggal a}} + \frac{\text{KBM kombinasi b}}{\text{KBM tunggal b}}$$

Interpretasi FBCI sama seperti FICI, yaitu bila FBCI total bernilai $\leq 0,5$ maka dikatakan sinergis, bernilai 0,5-4 bernilai aditif, sedangkan bila > 4 dikatakan antagonis¹⁰.

Analisa Data Statistik

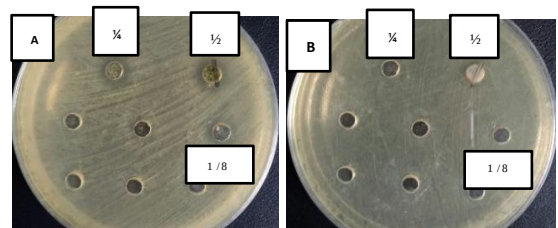
Penilaian ZOI dilakukan dengan cara mengukur zona bening yang mengitari sumuran. Pengukuran zona hambat menggunakan mistar dengan ketelitian 1 mm. kemudian data diolah untuk mendapatkan rata-rata dan standar deviasi. ZOI diuji statistik normalitas distribusi menggunakan *Kolmogrov-Smirnov*. Hasil uji tersebut didapatkan bahwa data tidak terdistribusi normal, maka dilakukan uji *non-parametric* menggunakan *Mann-Whitney*. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antara kelompok HDT+ADT dengan ADR. Analisa hasil Uji KHM tunggal antibiotik dilakukan menggunakan spektrofotometer EPOCH dengan program GEN

5(TM). Analisa hasil KHM dan KBM kombinasi dinilai dengan menggunakan FIC dan FBC indeks.

HASIL PENELITIAN

Zona Inhibisi Tunggal Antibiotik dan Ekstrak Sambiloto

Hasil ZOI herbal tunggal dapat dilihat pada gambar 1 dan tabel 2 didapatkan zona bening pada uji tunggal ekstrak sambiloto terhadap bakteri *S. aureus*. Diameter terbesar yang terbentuk berukuran 12,33 mm pada konsentrasi 0,5 mg/ml dan zona bening menghilang pada konsentrasi 0,125 mg/ml. Namun, pada bakteri *E. coli* tidak terbentuk zona bening, walaupun dengan konsentrasi pengujian yang sama terhadap bakteri *S. aureus*. Hasil ZOI tunggal antibiotik terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* didapatkan dari penelitian sebelumnya yang merupakan data kelompok penelitian bersama terlihat pada tabel 1¹².



Gambar 1: Hasil ZOI tunggal ekstrak sambiloto

Keterangan: A, ZOI ekstrak sambiloto terhadap bakteri *S. aureus*. B, ZOI ekstrak sambiloto terhadap bakteri *E. coli*.

Tabel 2. Rerata Zona Inhibisi Ekstrak Sambiloto terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Dilusi	Rerata Dalam Tiga Kali Pengulangan	
	(mm) $\bar{X} \pm SD$	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1/2	12,33 ± 1,52	0
1/4	10,33 ± 0,57	0
1/8	10 ± 1,00	0
1/16	0	0
1/32	0	0

Keterangan: 10-20 mm: daya hambat kuat; 5-10 mm: daya hambat sedang; ≤ 6 mm: daya hambat lemah

Tabel 1. Rerata Dalam Tiga Kali Pengulangan Hasil Pengukuran Zona Inhibisi Tunggal Antibiotik *Amoxicillin*, *Chloramphenicol*, *Cotrimoxazole* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

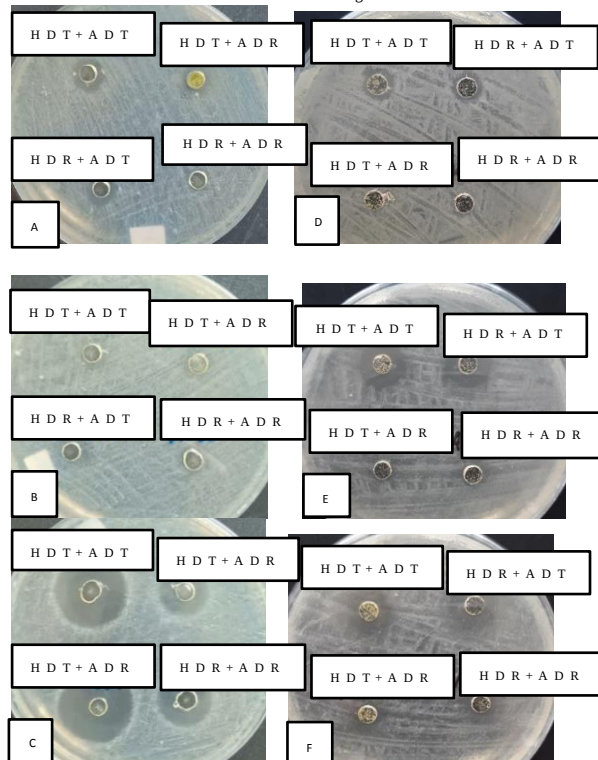
Konsentrasi	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	AMX (mm)	CHL (mm)	COT (mm)	AMX (mm)	CHL (mm)	COT (mm)
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
1/2	21,67 ± 1,52	32,67 ± 1,15	25,00 ± 3,00	16,67 ± 0,57	34,67 ± 1,15	20,67 ± 0,57
1/4	19,33 ± 1,52	29,33 ± 1,15	19,33 ± 1,52	13,33 ± 0,57	28,00 ± 3,46	16,33 ± 0,57
1/8	16,67 ± 1,52	24,00 ± 2,00	15,67 ± 2,08	11,00 ± 0	24,00 ± 2,00	14,33 ± 0,57
1/16	14,00 ± 2,00	19,67 ± 0,57	12,00 ± 1,00	10,67 ± 1,15	16,33 ± 4,72	12,00 ± 1,00
1/32	10,33 ± 2,08	15,67 ± 1,52	0	5,33 ± 4,61	12,00 ± 3,46	0

Keterangan: AMX, *Amoxicillin*; CHL, *Chloramphenicol*; COT, *Cotrimoxazole*

Pada tabel 1 menunjukkan rerata hasil ZOI tunggal antibiotik. Diameter ZOI terbesar terhadap bakteri *S. aureus* terdapat pada CHL yaitu sebesar 32,67 mm, selanjutnya diikuti dengan COT sebesar 25,00 mm, dan AMX sebesar 21,67 mm. Sedangkan diameter ZOI terbesar terhadap bakteri *E. coli* didapatkan pada CHL sebesar 34,67 mm, COT sebesar 20,67 mm, dan AMX 16,67 mm.

Zona Inhibisi Kombinasi Ekstrak Sambiloto dan Antibiotik

Hasil ZOI kombinasi ekstrak sambiloto dan antibiotik ditunjukkan pada tabel 3 halaman 6, perbandingan antara HDT+ADT dengan ADR tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Dilakukan perbandingan antara HDT+ADT dengan ADR, karena bila HDT+ADT dikombinasikan maka konsentrasi ADT akan sama dengan ADR.



Gambar 2. Kombinasi Ekstrak Sambiloto dengan antibiotik pada bakteri *S. aureus*.

Keterangan: A-C. Kombinasi Sb dengan AMX, CHL, COT terhadap *S. aureus*; D-F. Kombinasi Sb dengan AMX, CHL, COT terhadap *E. coli*.

Kadar Hambat Minimum Tunggal Ekstrak Sambiloto dan Antibiotik

Hasil KHM tunggal antibiotik dan ekstrak sambiloto dapat dilihat pada tabel 4. Nilai KHM ditentukan berdasarkan kadar terkecil yang masih tidak terdapat pertumbuhan bakteri. KHM ekstrak sambiloto tunggal terhadap bakteri *S. aureus* terdapat pada dosis 0,06mg/ml, sedangkan pada bakteri *E. coli* terdapat pada dosis 0,5mg/ml. Nilai KHM tunggal antibiotik AMX, CHL, dan COT terhadap bakteri *S. aureus* yaitu 0,01mg/ml. Hasil KHM tunggal antibiotik AMX dan CHL terhadap bakteri *E. coli* yaitu 0,01mg/ml, dan pada COT bernilai 0,001mg/ml.

Kadar Hambat Minimum Kombinasi Ekstrak Sambiloto dan Antibiotik

Pada tabel 5 menunjukkan hasil KHM kombinasi ekstrak sambiloto dengan antibiotik AMX, CHL dan COT. Nilai KHM kombinasi ekstrak sambiloto dan antibiotik AMX dan CHL terhadap bakteri *S. aureus* yaitu 0,007mg/ml. Pada hasil tersebut menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi dibandingkan dengan uji KHM tunggal antibiotik dan ekstrak sambiloto. sedangkan pada COT bernilai 0,01mg/ml yang menunjukkan peningkatan konsentrasi dibandingkan KHM ekstrak sambiloto tunggal. Hasil KHM kombinasi ekstrak sambiloto dan antibiotik AMX dan CHL terhadap bakteri *E. coli* yaitu 0,01mg/ml, yang mana pada hasil tersebut tidak menunjukkan adanya peningkatan maupun penurunan konsentrasi dibandingkan dengan uji tunggal antibiotik, namun bila dibandingkan dengan uji tunggal ekstrak sambiloto terjadi peningkatan konsentrasi. KHM pada COT bernilai 0,003mg/ml yang menunjukkan terjadinya penurunan konsentrasi dibandingkan dengan uji tunggal antibiotik.

Evaluasi KHM kombinasi ditentukan dengan nilai FIC, berdasarkan nilai FIC total, maka pada kombinasi ekstrak sambiloto dan ketiga antibiotik menghasilkan efek aditif, karena didapatkan FIC indeks 0,5-4. (Tabel 4)

Kadar Bunuh Minimum Tunggal Ekstrak Sambiloto dan Antibiotik

Hasil uji KBM tunggal ekstrak sambiloto dan antibiotik dapat dilihat pada tabel 6. KBM tunggal antibiotik terhadap *S. aureus* pada AMX bernilai 0,03mg/ml, pada CHL bernilai 0,25mg/ml, pada COT bernilai 0,125mg/ml. Sedangkan terhadap bakteri *E. coli* yaitu pada AMX bernilai 0,25mg/ml, pada CHL bernilai 0,03mg/ml, pada COT bernilai 0,06mg/ml. Hasil KHM tunggal ekstrak sambiloto terhadap *S. aureus* bernilai 0,5mg/ml, sedangkan terhadap bakteri *E. coli* tidak didapatkan nilai KBM.

Kadar Bunuh Minimum Kombinasi Ekstrak Sambiloto dan Antibiotik

Uji KBM kombinasi ekstrak sambiloto dan antibiotik dapat dilihat pada tabel 6. Pada uji KBM kombinasi ekstrak sambiloto dengan antibiotik AMX, CHL dan COT tidak didapatkan nilai KBM.

Tabel 3 Rata Zona Inhibisi Hasil Tunggul & Kombinasi Ekstrak Sanilitodan Antibiotik

Bakteri	Model Tunggul	Dilusi [AMK, CH, COL, Sb]	ZO ($\pm$ SD)				Model Kombinasi	Dilusi [Sb, [AMK]	ZO AMK ($\pm$ SD)	Dilusi [Sb, [CH]	ZO CH ($\pm$ SD)	Dilusi [Sb, [COL]	ZO COL ($\pm$ SD)
			Sb	AMK	CH	COL							
<i>S aureus</i>	HDT	[1/2]	12,33 $\pm$ 1,52				HDT+ADR	[1/2], [1/32]	10,00 $\pm$ 0	[1/2], [1/64]	9,33 $\pm$ 0,57	[1/2], [1/16]	9,33 $\pm$ 1,15
	HDR	[1/4]	10,33 $\pm$ 0,57				HDR+ADT	[1/4], [1/8]	12,33 $\pm$ 0,57	[1/4], [1/16]	12,00 $\pm$ 0,8	[1/4], [1/4]	12,66 $\pm$ 4,16
	ADT	[1/8], [1/16]		16,66 $\pm$ 1,52	19,66 $\pm$ 0,57	19,33 $\pm$ 1,52	HDT+ADT	[1/2], [1/8]	12,00 $\pm$ 1,00 ^a	[1/2], [1/16]	10,33 $\pm$ 0,57 ^b	[1/2], [1/4]	12,33 $\pm$ 0,57 ^c
	ADR	[1/32], [1/64], [1/16]		10,33 $\pm$ 2,08	11,66 $\pm$ 0,57	12,00 $\pm$ 1,00	HDR+ADR	[1/4], [1/32]	8,33 $\pm$ 5,50	[1/4], [1/64]	7,66 $\pm$ 6,65	[1/4], [1/16]	8,66 $\pm$ 3,05
<i>E coli</i>	HDT	[1/2]	0 $\pm$ 0				HDT+ADR	[1/2], [1/32]	0 $\pm$ 0	[1/2], [1/32]	0 $\pm$ 0	[1/2], [1/16]	0 $\pm$ 0
	HDR	[1/4]	0 $\pm$ 0				HDR+ADT	[1/4], [1/8]	4,66 $\pm$ 4,04	[1/4], [1/8]	12,00 $\pm$ 1,00	[1/4], [1/4]	12,00 $\pm$ 1,00
	ADT	[1/8], [1/16]		12,66 $\pm$ 1,15	24,00 $\pm$ 2,00	16,33 $\pm$ 0,57	HDT+ADT	[1/2], [1/8]	3,00 $\pm$ 5,19 ^a	[1/2], [1/8]	13,33 $\pm$ 0,57 ^b	[1/2], [1/4]	13,33 $\pm$ 2,30 ^c
	ADR	[1/32], [1/64], [1/16]		5,33 $\pm$ 4,61	12,00 $\pm$ 3,46	12,00 $\pm$ 1,00	HDR+ADR	[1/4], [1/32]	0 $\pm$ 0	[1/4], [1/32]	0 $\pm$ 0	[1/4], [1/16]	0 $\pm$ 0

Keterangan: Di dalam penelitian kali pengulangan zona inhibisi dengan uji *Min-Wilcoxon Test* ($p < 0,05$). AMK, *Amoxicillin*; CH, *Chloramphenicol*; COL, *Carimoxade*; Sb, *Sanilitodan*; HDT, *Haba Dosis Tinggi*; HDR, *Haba Dosis Rendah*; ADT, *Antibiotik Dosis Tinggi*; ADR, *Antibiotik Dosis Rendah*; ^a, tidak berbeda signifikan terhadap ADR pada bakteri *S aureus* & *E coli*; ^b, tidak berbeda signifikan terhadap ADR pada bakteri *S aureus* & *E coli*; ^c, tidak berbeda signifikan terhadap ADR pada bakteri *S aureus* & *E coli*.

Tabel 4 Kadar Hambat Minimum Kombinasi Ekstrak Sambiloto dengan Antibiotik Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Bakteri	Dilusi	KHM Tunggal				KHM Kombinasi		
		[Sb]	[AMK]	[CHL]	[COL]	[AMK88b]	[CHL88b]	[COL88b]
<i>S aureus</i>	1	-						
	1/2	-	-	-	-			
	1/4	-	-	-	-			
	1/8	-	-	-	-			
	1/16	-*	-	-	-	1/2	1/2	1/2
	1/32	+	-	-	-	-	-	-
	1/64	+	-*	-*	-*	-	-	-*
	1/128		+	+	+	-*	-*	+
	1/256		+	+	+	+	+	+
	1/512		+	+	+			
<i>E coli</i>	2							
	1							
	1/2	-*	-	-	-			
	1/4	+	-	-	-			
	1/8	+	-	-	-			
	1/16	+	-	-	-	2	2	
	1/32	+	-	-	-	-	-	
	1/64	+	-*	-*	-	-*	-*	
	1/128		+	+	-	+	+	2
	1/256		+	+	-	+	+	-*
	1/512		+	+	-*			+
	1/1024		+	+	+			+
	1/2048		+	+	+			+

Keterangan

[KHM, Kadar Hambat Minimum; [Sb], Konsentrasi Ekstrak Sambiloto; [AMK], Amoxicillin; [CHL], Chloramphenicol; [COL], Carimoxade; [AMK88b], Amoxicillin kombinasi Ekstrak Sambiloto; [CHL88b], Chloramphenicol kombinasi Ekstrak Sambiloto; [COL88b], Carimoxade kombinasi Ekstrak Sambiloto; 1/2, Konsentrasi hambat awal dalam kombinasi terhadap *S aureus*; 2, Konsentrasi hambat awal dalam kombinasi terhadap *E coli*; *, Kadar Hambat Minimum yang dihasilkan; +, Adanya eritema pada tabung; -, Tidak ditemukan eritema pada tabung

Tabel 5 *Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI)* Ekstrak Sanhilitodengan Antibiotik Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Bakteri	<i>Fractional Inhibitory Concentration</i>			Sifat	<i>Fractional Inhibitory Concentration</i>			Sifat	<i>Fractional Inhibitory Concentration</i>			Sifat
	FICI Sb	FICI AMK	Σ FICI		FICI Sb	FICI CHL	Σ FICI		FICI Sb	FICI COT	Σ FICI	
<i>E. coli</i>	1,0	1,0	2,0	Aditif	1,0	1,0	2,0	Aditif	1,0	2,0	3,0	Aditif
<i>S. aureus</i>	1,0	0,5	1,5	Aditif	1,0	0,5	1,5	Aditif	2,0	1,0	3,0	Aditif

Keterangan

FICI, *Fractional Inhibitory Concentration Index*; Σ FICI, *Fractional Inhibitory Concentration Total*; Sb, Ekstrak Sanhilito; AMK, Amoxicillin; CHL, Chloramphenicol; COT, Cotrimoxazole; Aditif, Nilai FICI antara 0,5-4

Tabel 6 Kadar Bunuh Minimum Kombinasi Ekstrak Sanhito dengan Antibiotik Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Bakteri	Lulus	KBM Tunggal				KBM Kombinasi		
		[Sb]	[AMK]	[CHL]	[COL]	[Sb & AMK]	[Sb & CHL]	[Sb & COL]
<i>S aureus</i>	1							
	1/2	-*	-	-	-			
	1/4	+	-	-*	-			
	1/8	+	-	+	-*			
	1/16	+	-	+	+	+1/2	+1/2	+1/2
	1/32	+	-*	+	+	+	+	+
	1/64	+	+	+	+	+	+	+
	1/128		+	+	+	+	+	+
	1/256		+	+	+	+	+	+
	1/512		+	+	+			
<i>E coli</i>	2							
	1							
	1/2	+	-	-	-			
	1/4	+	-*	-	-			
	1/8	+	+	-	-			
	1/16	+	+	-	-*	+2	+2	
	1/32	+	+	-*	+	+	+	
	1/64	+	+	+	+	+	+	
	1/128		+	+	+	+	+	+2
	1/256		+	+	+	+	+	+
	1/512		+	+	+			+
	1/1024		+	+	+			+
	1/2048		+	+	+			+

Keterangan: KBM Kadar Bunuh Minimum [Sb], Konsentrasi Ekstrak Sanhito [AMK], Amoxicillin [CHL], Chloramphenicol [COL], Carinocazole [S&AMK], Ekstrak Sanhito kombinasi Amoxicillin [S&CHL], Ekstrak Sanhito kombinasi Chloramphenicol [S&COL], Ekstrak Sanhito kombinasi Carinocazole, 1/2, Konsentrasi herbal dan kombinasi terhadap *S aureus*, 1/4 Konsentrasi herbal dan kombinasi terhadap *E coli*; *, Kadar Bunuh Minimum yang dihasilkan; +, Adanya koloni bakteri di media; -, Tidak ditemukan koloni bakteri di media

PEMBAHASAN

Daya Hambat Tunggal Ekstrak Sambiloto dan Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Pada hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa daya hambat pada antibiotik tunggal lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak sambiloto tunggal, baik terhadap bakteri *S. aureus* maupun terhadap bakteri *E. coli*. Hal tersebut dapat terjadi karena ekstrak sambiloto yang digunakan memiliki berbagai senyawa aktif yang mana senyawa aktif tersebut dapat berinteraksi satu sama lain, sehingga efektifitasnya tidak lebih kuat dibandingkan dengan antibiotik¹³.

Antibiotik *amoxicillin*, *chloramphenicol*, dan *cotrimoxazole* memiliki mekanisme yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri. *Amoxicillin* bekerja menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu reaksi transpeptidasi sintesis dinding sel bakteri. *Chloramphenicol* bekerja dengan cara berikatan pada ribosom 50s, sehingga ikatan peptida tidak terbentuk pada proses sintesis protein bakteri¹⁴. Sedangkan pada antibiotik *cotrimoxazole* yang merupakan kombinasi dari dua antibiotik memiliki mekanisme menghambat metabolisme sel pada bakteri.

Adapun pada hasil uji zona inhibisi tunggal ekstrak sambiloto terhadap bakteri *S. aureus* memiliki efek sebagai antibakteri. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Jayakumar (2013) yang menyatakan bahwa ekstrak sambiloto memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*⁷. Diameter zona hambat terbesar terhadap bakteri *S. aureus* didapatkan pada konsentrasi 1/2 yaitu sebesar 12,33mm dan diameter zona hambat terkecil terdapat pada konsentrasi 1/8 sebesar 10mm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan, maka zona hambat yang dihasilkan juga semakin besar¹⁵. Menurut Schlegel dan Schmidt (1994), kemampuan suatu bahan antimikroba tergantung pada konsentrasi bahan antimikroba tersebut¹⁶. Sedangkan uji zona inhibisi ekstrak sambiloto terhadap bakteri *E. coli* tidak terbentuk zona bening disekitar lubang sumuran walaupun konsentrasi pengujian ekstrak sambiloto sama dengan bakteri *S. aureus*. Hal itu dapat terjadi karena adanya perbedaan pada struktur dinding sel, dimana pada bakteri gram negatif struktur selnya lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri gram positif¹⁷. Diketahui pula bahwa bakteri gram positif *S. aureus* memiliki tekanan osmotik 3-5 kali lebih besar dibandingkan dengan gram negatif, sehingga lebih muda mengalami lisis¹³. Tanpa dinding sel, bakteri tidak tahan dengan pengaruh luar dan segera mati¹⁸. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Oboh *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa bakteri gram negatif lebih tahan terhadap senyawa antimikroba dibanding dengan bakteri gram positif¹⁹.

Kandungan aktifitas antibakteri yang dimiliki ekstrak sambiloto yaitu saponin, flavonoid, tanin dan alkaloid. Dimana masing-masing senyawa memiliki mekanisme yang berbeda-beda. Saponin dan flavonoid memiliki mekanisme kerja dalam menghambat bakteri yaitu dengan cara merusak membran sitoplasma pada bakteri, sehingga akan mengganggu kelangsungan hidup pada bakteri. Di sisi lain tanin dan alkaloid bekerja pada dinding sel bakteri. Tanin dapat mengganggu permeabilitas dinding sel dengan cara mengerutkan dinding sel bakteri, sedangkan alkaloid mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel pada bakteri tidak terbentuk secara utuh²⁰.

Daya Hambat Kombinasi Ekstrak Sambiloto dan Antibiotik Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Menurut data yang didapatkan dengan penilaian metode A Z D A S T, hasil kombinasi antara ekstrak sambiloto dengan antibiotik *amoxicillin*, *chloramphenicol*, dan *cotrimoxazole* terhadap bakteri *S. aureus* memberikan efek aditif. Efek aditif yang berarti pada kombinasi tersebut tidak menimbulkan efek yang lebih besar dibandingkan dengan efek masing-masing bila diberikan secara tunggal²¹. Hasil penilaian tersebut sama dengan hasil FIC yang mana memberikan efek aditif.

Berbeda dengan ZOI kombinasi ekstrak sambiloto dan antibiotik *amoxicillin* memberikan efek antagonis terhadap bakteri *E. coli* karena diameter ZOI kombinasi tersebut lebih kecil daripada diameter ZOI *amoxicillin* tunggal. Hasil tersebut tidak sama dengan nilai FIC yang menunjukkan sifat aditif. Perbedaan hasil ZOI dan FIC dapat terjadi di duga karena pada uji ZOI dan KHM menggunakan media yang berbeda, sehingga menyebabkan proses difusi dari bahan coba akan berbeda dan akan mempengaruhi efektifitasnya²². Namun setelah di uji statistik pada ZOI kombinasi tersebut tidak didapatkan perbedaan yang signifikan, sehingga bersifat aditif.

Pada uji kadar bunuh minimum diukur menggunakan nilai *Fractional Bactericidal Concentration Index* total. Namun FBC total tidak dapat dihitung nilainya, karena uji kadar bunuh minimum kombinasi ekstrak sambiloto dengan antibiotik *amoxicillin*, *chloramphenicol* dan *cotrimoxazole* terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* tidak didapatkan hasilnya. Tidak adanya hasil kadar bunuh minimum diduga karena kombinasi ekstrak sambiloto dan antibiotik hanya bekerja secara bakteriostatik. Hal tersebut sama seperti penelitian lain yang menyatakan bahwa nilai hasil uji KBM yang relatif jauh lebih besar dari nilai KHM -nya diperoleh karena sifat bakteriostatiknya, sehingga diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi untuk dapat membunuh bakteri²³.

Di sisi lain hasil uji KBM kombinasi didapatkan peningkatan nilai KBM dibandingkan dengan uji tunggalnya, yang mana menunjukkan

bahwa penambahan ekstrak sambiloto menyebabkan efek antagonis. Hal tersebut terjadi diduga karena penurunan efektifitas kerja antibiotik bila dikombinasikan dengan ekstrak sambiloto. Menurut Hanik *et al.*, (2012) pada ekstrak herbal memiliki banyak senyawa kimia, sehingga dapat terjadi variasi interaksi antara banyaknya senyawa kimia pada ekstrak herbal tersebut yang dapat memberikan efek antagonisme²⁴.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang didapatkan pada penelitian ini yaitu:

1. Kombinasi Ekstrak Sambiloto dengan antibiotik AMX, CHL, dan COT terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* tidak memberikan efek yang lebih baik daripada penggunaan antibiotik tunggal.
2. Berdasarkan uji ZOI menggunakan metode AZDAST dan uji KHM, kombinasi ekstrak sambiloto dengan antibiotik AMX, CHL, dan COT menghasilkan efek aditif terhadap bakteri *S. aureus* dan bakteri *E. coli*.
3. Kombinasi ekstrak sambiloto dengan antibiotik AMX, CHL, dan COT terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* pada uji KBM tidak dapat dievaluasi karena diluar dosis uji.

SARAN

Adapun saran untuk dapat meningkatkan penelitian ini kedepannya yaitu:

1. Melakukan fraksinasi senyawa herbal Melakukan uji *in vivo* untuk mengetahui efek lain dari herbal sambiloto sebagai adjuvant
2. Melakukan percobaan *in silico* antara senyawa aktif dominan pada herbal sambiloto terhadap *Penicillin Binding Protein* (PBP), ribosom subunit 50s, dan enzim penghambat asam folat untuk menilai koefisien interaksinya.
3. Melakukan uji fitokimia untuk mengidentifikasi jenis senyawa aktif pada herbal sambiloto yang bersifat sebagai antibakteri.
4. Melakukan fraksinasi senyawa herbal sambiloto, untuk mengetahui senyawa yang dapat berinteraksi dengan antibiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) selaku yang memberikan dana penelitian, kelompok penelitian yang telah membantu dalam berjalannya penelitian serta dr. Dini Sri Damayanti, M.Kes selaku reviewer.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes. *Pedoman Penggunaan Antibiotik*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 2011
2. AMRIN study group. *Antimicrobial Resistance, Antibiotic Usage and Infection Control*. Jakarta : Directorate General of Medical Care Ministry of Health Republic of Indonesia. 2005

3. WHO. *Global Action Plan On Antimicrobial Resistance*. Switzerland : WHO Document Production Services. 2015
4. 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 Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009
5. Choirunnisa, A., Sutjiatmo, A.B. Pengaruh Kombinasi Ekstrak Etanol Herba Cecendet (*Physalis angulata* L.) Dengan Beberapa Antibiotik Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Klebsiella pneumoniae*. *Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5(2), 51-52. 2017
6. Sinaga, L., Suryanto, D., Lesmana, I. Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Dalam Mengendalikan Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda* dan Jamur *Saprolegnia* sp. Secara In Vitro. *Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara, Medan*, p. 8. 2015
7. Jayakumar, T., Hsieh, C. Y., Lee, J. J., & Sheu, J. R. Experimental and Clinical Pharmacology of *Andrographis paniculata* and Its Major Bioactive Phytoconstituent Andrographolide. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol 2013, p. 10. 2013
8. Davis & Stout. Disc Plate Method Of Microbiological Antibiotic Essay. *Journal Of Microbiology*. Vol 22 No 4. 1971
9. Andrews, J.M. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(Supplement S1), pp.5-6. 2001
10. Hallander HO., Dornbusch K., Gezelius L. *et al.* Synergism between Aminoglycosides and Cephalosporins with Antipseudomonal Activity: Interaction Index and Killing Curve Method. *National Bacteriological Laboratory*. Sweden. 1982.
11. Tripathi KD. *Essentials of Medical Pharmacology* 7th ed, India: Jaypee Brothers Medical Publisher. New Delhi. 2013
12. Anggraeni, A.D. Efek Kombinasi Ekstrak *Zingiber Zerumbet* L. dengan Amoksisilin, Kloramfenikol, dan Kotrimoksazol Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Skripsi Program Sarjana. Universitas Islam Malang. 2018

13. Juliantina, F., Citra, D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T., Bowo, E.T. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Antibakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia* 1(1): 13. 2009
14. Rahmawati et al. 2012
15. Katzung B. G. *Basic and Clinical Pharmacology*. 10th ed. McGraw Hill. Boston. 2007
16. Sari, R., Muhani, M., Fajriaty, I. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Gaharu (Aquilaria microcarpa Baill.) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Proteus mirabilis*. Original Article. Fakultas Farmasi. Universitas Tanjungpura. Pontianak. 2017
17. Schlegel dan Schmidt, K. *Mikrobiologi Umum*. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta. 1994
18. Lestari, Y., Ardianingsih, P., Nurliana. *Aktivitas Antibakteri Gram Positif Dan Negatif Dari Ekstrak Dan Fraksi Daun Nipah (Nypa Fruticans Wurmb.) Asal Pesisir Sungai Kakap Kalimantan Barat*. Volume 5(4), halaman 1-8. 2016
19. Wattimena JR et al. *Farmakodinami dan Terapi Antibiotik*. Yogyakarta: UGM. 1991
20. Oboh C.A. et al. Chemical, Microbiological, and Sensory Properties of Fermented Fish Products from *Sardinella* sp. In Nigeria. *J Aquatic Food Product Tech* 11(2):53 – 59. 2007
21. Najibah, Z., Kusumowati, I.T.D., Munawaroh, R. *Potensi Antibakteri Kombinasi Streptomisin Dan Amoksisilin Dengan Minyak Atsiri Kemangi (Ocimum Basilicum L.) Terhadap Salmonella Thypi*. Skripsi Program Sarjana. Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2014
22. Cheung A L., Fieschetti V A., Variation in the expression of cell wall proteins of *staphylococcus aureus* grown on solid and liquid media. *NCBI*. 1988
23. Kurniati, F.N., Garmana, A.N., Azizi, N. *Aktivitas Antibakteri Dan Antijamur Ekstrak Etanol Akar, Bunga, Dan Daun Turi (Sesbania Grandiflora L. Poir)*. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. Vol 42. Hal.6. 2017
24. Hanik, I., Yuliani, R., Indrayudha, P. *Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Buah Delima (Punica Granatum L.) Dan Kloramfenikol Terhadap Staphylococcus Aureus Sensitif Dan Multiresisten Antibiotik*. Skripsi Program Sarjana. Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2012