

NASKAH PUBLIKASI

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL
AKAR PEPAYA (*Carica papaya*) TERHADAP BAKTERI
Streptococcus pneumoniae DAN *Vibrio cholerae***



SAMIALHUDA RAHMATI FITRIA

I11110060

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA**

2016

**LEMBAR PENGESAHAN
NASKAH PUBLIKASI**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL AKAR
PEPAYA (*Carica papaya*) TERHADAP *Streptococcus
pneumoniae* DAN *Vibrio cholerae***

TANGGUNG JAWAB YURIDIS MATERIAL PADA

**Samialhuda Rahmati Fitria
I11110060**

DISETUJUI OLEH

PEMBIMBING UTAMA



**dr. Nawangsari, M. Biomed
NIP. 198105102008012017**

PEMBIMBING KEDUA



**dr. lit Fitrianingrum
NIP. 198207222008122002**

PENGUJI PERTAMA



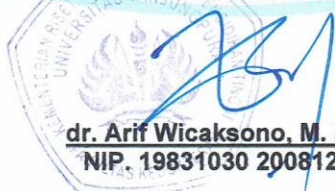
**dr. Agung Nugroho, M. Sc., Sp. PD
NIP. 197004052001121001**

PENGUJI KEDUA



**dr. Sari Rahmayanti
NIP. 198705082014042001**

**MENGETAHUI
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS TANJUNGPURA**



**dr. Arif Wicaksono, M. Biomed
NIP. 19831030 200812 1 002**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL AKAR PEPAYA
(*Carica papaya*) TERHADAP *Streptococcus pneumoniae* DAN
*Vibrio cholerae***

Samialhuda Rahmati Fitria¹; Nawangsari², lit Fitrianingrum³; Sri
Wahdaningsih⁴

Abstrak

Latar Belakang: Pneumonia dan diare merupakan penyakit infeksi utama penyebab kematian pada anak secara global. Penyakit diare akut yang menjadi penyebab kematian pada anak adalah penyakit diare akut kolera yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae*. Sedangkan kasus pneumonia tersering pada anak-anak adalah pneumonia bakterial yang disebabkan oleh *Streptococcus pneumoniae*. Tumbuhan pepaya dipercaya memiliki berbagai macam manfaat yang dapat digunakan sebagai obat pada beberapa kelompok masyarakat. Penelitian ini diharapkan mampu membantu menambah daftar jumlah bahan alam yang dapat dijadikan bahan obat dalam mengatasi permasalahan tersebut diatas **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa akar pepaya memiliki efek antibakteri terhadap *Streptococcus pneumoniae* dan *Vibrio cholerae*. **Metodologi:** Akar pepaya diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan skrining fitokimia. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. **Hasil:** Berdasarkan skrining fitokimia, ekstrak etanol akar pepaya mengandung senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, tanin, dan glikosida. Ekstrak etanol akar pepaya tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. pneumoniae* dan *V. cholerae*. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol akar pepaya tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. pneumoniae* dan *V. cholerae*.

Kata Kunci: Antibakteri, Ekstrak etanol akar pepaya, *S. pneumoniae* dan *V. cholerae*

- 1) Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat
- 2) Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat
- 3) Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura Pontianak, Kalimantan Barat
- 4) Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF ETHANOL EXTRACTS OF
PAPAYA ROOTS (*Carica papaya*) AGAINST *Streptococcus
pneumoniae* AND *Vibrio cholerae***

Samialhuda Rahmati Fitria¹; Nawangsari², lit Fitrianingrum³; Sri
Wahdaningsih⁴

Abstract

Background: pneumonia and diarrhea are the main cause of death on children at a global scale. Acute diarrheal disease is the cause of death in children caused by *Vibrio cholerae*. Meanwhile the most frequent cases of pneumonia in children is caused by bacterial pneumonia *Streptococcus pneumoniae*. The problems which still occur in the practice of medicine is the use of antibiotics are at risk of adverse effect fairly requires attention and vigilance as well as an increased level of resistance. This research is expected to help add to the list the number of natural ingredients that can be used as ingredients in addressing the above issues. **Objective:** This study aims to prove that the roots of papaya has an antibacterial effect against *S. pneumoniae* and *V. cholerae*. **Method:** Papaya roots was extracted by maceration method using 70% ethanol. Chemical compounds of this extract were determined by phytochemical screening. Antibacterial activity test was determined by Kirby-Bauer Disc Diffusion method. **Result:** Based on phytochemical screening, ethanol extracts of papaya roots contain alkaloids, phenols, flavonoids, saponins, tannins, and glicoside. Ethanol extracts of papaya roots didn't showed antibacterial activity against the growth of *S. pneumoniae* and *V. cholera*. **Conclusion:** Ethanol extracts of papaya roots didn't has antibacterial activity against *S. pneumoniae* and *V. cholera*.

Keywords: Antibacterial, Ethanol extracts of Papaya roots, *S. pneumoniae* and *V. cholera*

- 1) Medical School, Faculty of Medicine, University of Tanjungpura Pontianak, West Kalimantan.
- 2) Medical School, Faculty of Medicine, University of Tanjungpura Pontianak, West Kalimantan.
- 3) Medical School, Faculty of Medicine, University of Tanjungpura Pontianak, West Kalimantan.
- 4) Pharmacy Study Program, Faculty of Medicine, Universitas Tanjungpura, Pontianak, West Kalimantan

LATAR BELAKANG

Pneumonia dan diare merupakan penyakit infeksi utama penyebab kematian pada anak secara global. Penyakit infeksi tersebut menyebabkan 29% kematian pada anak, lebih dari 2 juta setahun.¹ Penyakit diare yang dimaksud adalah penyakit diare akut. Penyakit diare akut yang menjadi penyebab kematian pada anak adalah penyakit diare akut kolera yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae*. Sedangkan kasus pneumonia tersering pada anak-anak adalah pneumonia bakterial yang disebabkan oleh *Streptococcus pneumoniae*.^{2,3}

Di Indonesia, diare dan pneumonia menyebabkan kematian sebanyak 25,2% dan 15,5% pada kelompok umur 1-4 tahun. Menurut Survei Demografi Kesehatan Indonesia (SDKI), Angka Kematian Bayi atau AKABA pada tahun 2007 sebesar 44 per 1000 kelahiran hidup. Menurut Riskesdas tahun 2007, pneumonia merupakan penyakit penyebab kematian kedua tertinggi setelah diare diantara balita dengan jumlah kematian balita akibat pneumonia tahun 2007 adalah 30.470 balita (15,5% x 196,579) atau rata-rata 83 orang balita meninggal setiap hari akibat pneumonia.^{4,5} Penyakit diare akut yaitu kolera menurut laporan WHO juga terus meningkat. Pada tahun 2011 saja terdapat total 589.854 kasus kolera dari 58 negara, termasuk 7.816 kematian. Beban sebenarnya penyakit kolera ini diperkirakan menjadi 3-5 juta kasus dan 100.000-120.000 kematian setiap tahunnya.²

Permasalahan yang hingga kini masih terjadi pada penggunaan antibiotik tersebut adalah efek samping obat yang cukup memerlukan perhatian dan kewaspadaan. Antibiotik seperti doksisisiklin, dan tetrasiklin, dapat menyebabkan mual dan muntah serta diare, pusing, insomnia, ruam kulit, dan uji fungsi hati yang abnormal pada fluorokuinolon dan turunannya. Selain itu, fluorokuinolon dapat melukai kartilago yang sedang bertumbuh dan menyebabkan atropati sehingga biasanya tidak dianjurkan pada

penderita berusia dibawah 18 tahun.^{6,7} Pada penggunaan azitromisin dapat menyebabkan perubahan abnormal pada aktivitas listrik jantung yang secara potensial memicu ritme jantung tidak teratur. Azitromisin adalah suatu makrolida yang digunakan pada pengobatan pneumonia dan kolera telah dinyatakan memberikan resiko kematian akibat kardiovaskular secara signifikan lebih besar dibandingkan siprofloksasin.^{8,9}

Selain resiko efek samping, masalah yang sering muncul sampai saat ini adalah resistensi terhadap antibiotik tersebut. Resistensi terhadap *S. pneumonia* telah terjadi penambahan urgensi pada perkembangan vaksin pneumokokal yang lebih efektif.^{10,11} Resistensi pada *S. pneumoniae* telah meningkat secara luas diseluruh dunia. Sebagian besar strain ini menunjukkan resistensi terhadap multipel antibiotik dan terdapat pada serotipe 6A, 6B, 19A, 19F, dan 23F.¹² Resistensi terhadap tetrasiklin dan agen antimikroba lainnya diantara *V. cholerae* telah didemonstrasikan pada baik endemik maupun epidemik kolera.¹³

Tumbuhan pepaya dipercaya memiliki berbagai macam manfaat yang dapat digunakan sebagai obat pada beberapa kelompok masyarakat. Bagian tumbuhan pepaya yang ingin saya teliti adalah pada bagian akar (*Carica papaya*). *Carica papaya* mengandung banyak bahan aktif secara biologi.¹⁴ Fitokonstituen di atas berperan dalam aktivitas antibakteri. Telah banyak penelitian mengenai ekstrak berbagai bagian pepaya dengan menggunakan pelarut metanol, etanol, dan air, baik efek aktifitas antibakteri maupun antifungi serta terhadap berbagai parasit seperti malaria dan demam berdarah dengue.^{14,15,16,17,18} Adanya penelitian ini diharapkan akan membantu menambah daftar jumlah bahan alam yang dapat dijadikan bahan obat dalam mengatasi permasalahan tersebut diatas yang sesuai dengan dinamika karakter berbagai serotipe dan resistensi antibiotik pada kedua bakteri diatas serta pengaruhnya dalam dunia kedokteran.

BAHAN DAN METODE

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu neraca digital (Bel®), neraca analitik (Mettler PM 300®), oven (Memmert®), blender, liofilizer, *Laminar Air Flow (LAF) cabinet* (Airtech®), *Biological Safety Cabinet* (BSC) (ESCO class II type B2®), *autoclave* (HL-36Ae®), spatula, corong pisah (Interkey®), corong gelas (Iwaki Pyrex®), penangas air, gelas ukur 10 mL dan 100 mL (Iwaki Pyrex®), kertas saring whatman, tabung reaksi 5 mL (Iwaki Pyrex®), labu ukur 10 mL dan 25 mL (Iwaki Pyrex®), maserator, *rotary evaporator* (Heidolph®), sendok *stainless*, batang pengaduk (Iwaki Pyrex®), rak tabung reaksi, kertas aluminium, jarum ose, 8mm *cork borer*, gelas bundar, dan forsep, cawan petri (Pyrex®), inkubator (Memmert®), lemari pendingin, plat tetes, erlenmeyer (Pyrex®), pipet tetes, pipet *volume* (Iwaki Pyrex®), standar McFarland no. 0,5, penggaris (Joyko®), cawan Petri (Iwaki Pyrex®), plastik tahan panas (Wayang®), dan kertas sampul, (Oxoid®).

Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu etanol 70%, simplisia akar pepaya, 1% HCl, reagen Mayer, reagen Wagner, ferum klorida (FeCl_3), 10% larutan potasium hidroksida, larutan sodium (natrium) hidroksida, aluminium klorida (AlCl_3), asam (vi) tetraoksosulfat (H_2SO_4), 20% potasium (kalium) hidroksida (KOH), air suling atau akuades, larutan Fehling, gliserol, reagen agar Muller Hinton, 2,5-5% darah domba atau kuda, Media Nutrient agar, larutan natrium klorida (NaCl), agar *thiosulfate citrate bile salts sucrose* (TCBS), DMSO (*dimethylsulphoxide*) 10%, dan ekstrak etanol akar *Carica papaya*.

Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu kultur murni *Streptococcus pneumoniae* dan *Vibrio cholerae* yang didapat dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Indonesia Jakarta.

Prosedur Kerja

Pengolahan Sampel

Sampel, yang digunakan pada penelitian ini adalah akar pepaya. Akar pepaya yang telah dikumpulkan, disortasi basah, kemudian dicuci menggunakan air mengalir sampai bersih, dirajang, dikeringkan pada udara panas dibawah sinar matahari langsung. Simplisia disortasi kering, selanjutnya dijadikan serbuk dengan menggunakan *blender* dan dilakukan pengepakan dan penyimpanan.

Ekstraksi

Sebanyak 400 gram serbuk simplisia akar pepaya dimasukkan kedalam bejana maserasi kemudian dilakukan maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% sampai serbuk simplisia terendam semua. Kemudian ditutup dan didiamkan sambil sesekali diaduk. Proses maserasi dilakukan dengan mengganti pelarut tiap 1x24 jam selama tiga hari. Hasil maserasi dikumpulkan dan disaring. Filtratnya kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak etanol akar pepaya. Pengentalan ekstrak dilanjutkan menggunakan *water bath*. Ekstrak kemudian disimpan dalam wadah kaca yang dilapisi aluminium foil.

Skrining Fitokimia

Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak sampel masing-masing sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur dengan 5 ml kloroform dan 5 ml amoniak kemudian dipanaskan, dikocok dan disaring. Ditambahkan 5 tetes asam sulfat pada masing-masing filtrat, kemudian kocok dan didiamkan. Bagian atas dari masing-masing filtrat diambil dan diuji dengan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendroff. Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer, endapan coklat pada pereaksi Wagner, dan endapan orange atau jingga pada pereaksi Dragendroff menunjukkan adanya alkaloid.^{19,20,21}

Pemeriksaan Fenol

Ekstrak sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes air panas dan beberapa tetes pereaksi FeCl_3 1%. Jika warna larutan berubah menjadi warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat menunjukkan adanya senyawa fenol.²²

Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak Sampel dicampur dengan 5 ml etanol, dikocok, dipanaskan, dan dikocok lagi kemudian disaring. Kemudian ditambahkan Mg 0,2 g dan 3 tetes HCl pada masing-masing filtrat. Jika terjadi perubahan warna menjadi jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya favonoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.^{20,23}

Pemeriksaan Tanin

Ekstrak sampel masing-masing sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi 1 dan 2. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 1% pada tabung 1. Hasil positif ditandai dengan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan. Sampel pada tabung 2 ditambahkan beberapa tetes larutan gelatin 2%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih.^{21,23,24}

Pemeriksaan Saponin

Larutan ekstrak sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 mL akuades dan dikocok kuat selama 10 menit. Hasil dinyatakan positif apabila buih yang terbentuk stabil selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCL 2N, busa tidak hilang.^{23,25}

Pemeriksaan Glikosida

Ekstrak sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes *Molisch*, ditambahkan dengan hati-hati 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung, terbentuknya cincin ungu

pada batas kedua cairan menunjukkan adanya gula, dengan demikian menunjukkan adanya glikosida.²³

Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri yang dilakukan antara lain pewarnaan Gram, klultur pada medium selektif *TCBS* dan agar darah, dan uji biokimia yang meliputi uji gula manitol, *TSIA* (*Triple Sugar Iron Agar*), uji *iMViC*, uji motilitas dan uji fermentatif-oksidatif.

Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode *Disc Diffusion* Kirby-Bauer

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi modifikasi Kirby-Bauer yang terstandarisasi oleh NCCLS Media yang digunakan menggunakan agar Mueller-Hinton, ditambahkan 5% darah sama dengan 50 ml darah/l medium pada *S pneumoniae*.²⁶ Piringan agar dengan kedalaman 3-4 mm. Ambil koloni bakteri, sebaiknya 3-5 koloni. Siapkan dan standarisasi suspensi inokulum. Turbiditas suspensi harus sesuai dengan standar 0.5 McFarland. Inokulasikan lempeng dengan cara mencelupkan lidi kapas steril ke dalam inokulum. Singkirkan inokulum berlebih dengan menekan dan memutar lidi kapas kuat-kuat pada sisi tabung di atas batas cairan. Guratkan lidi kapas ke seluruh permukaan media tiga kali, dengan memutar lempeng dengan sudut 60° setelah setiap pengolesan. Lewatkan lidi kapas ke sekeliling pinggiran permukaan agar. Biarkan inokulum mengering selama beberapa menit pada suhu ruang dengan cawan tertutup. Cakram antimikroba dapat diletakkan pada lempeng yang telah diinokulasi dengan menggunakan sepasang penjepit steril atau cetakan. Setelah diinkubasi semalaman, diameter tiap zona (termasuk diameter cakram) harus diukur dan dicatat dalam mm. Hasil diinterpretasikan menurut diameter kritis. Titik akhir hambatan dinilai dengan mata telanjang pada tepi tempat pertumbuhan dimulai.^{26,27}

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Serbuk Simplisia Akar Pepaya

Proses ekstraksi dengan cara maserasi dilakukan selama 4 hari dengan penggantian pelarut setiap 1x24 jam. Serbuk simplisia akar pepaya dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Maserasi dilakukan menggunakan wadah kaca yang dilapisi dengan alumunium foil. Pelarut ditambahkan hingga serbuk simplisia terendam semua. Maserasi menggunakan sampel sebanyak 400 gram serbuk simplisia akar pepaya. Selama maserasi dilakukan pengadukan berulang agar kontak antara pelarut dengan bahan lebih optimal sehingga kondisi jenuh yang terlalu cepat dapat dihindari. Hasil ekstrak cair yang didapat dari proses evaporasi selanjutnya diuapkan lagi dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 55°. Ekstrak etanol akar pepaya berwarna coklat, berbau khas konsistensinya kental dan tidak dapat dituang dalam keadaan dingin.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan salah satu cara untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada suatu tanaman secara kualitatif.²⁶ Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% akar pepaya diperoleh hasil positif pada senyawa saponin, alkaloid, tanin, flavonoid fenol dan glikosida yang dapat dilihat pada tabel 1. di bawah ini:

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Akar Pepaya (Data Primer, 2014)

No	Pemeriksaan	Pereaksi	Hasil	Keterangan
1.	Alkaloid	Mayer	+	Terbentuk endapan putih
		Wagner	+	Terbentuk endapan cokelat
2.	Fenol	Air panas, FeCl ₃ 1%	+	Terbentuk warna hijau kehitaman
3.	Flavonoid	HCl, Mg	+	Terbentuk warna kuning jingga
4.	Saponin	Akuades	+	Terbentuk busa yang persisten setinggi 1 cm
5.	Tanin	FeCl ₃ 1%	+	Terbentuk warna hitam kehijauan
6.	Glikosida	Molisch, H ₂ SO ₄	+	Terbentuk cincin ungu pada batas kedua cairan

Keterangan : + = Positif, ada kandungan senyawa

Hasil Identifikasi Bakteri Uji

Bakteri uji pada penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus pneumoniae* dan *Vibrio cholerae* yang diperoleh dari Laboratorium FKUI, Jakarta. Identifikasi bakteri uji meliputi pewarnaan Gram, kultur pada medium selektif agar darah pada *Streptococcus pneumoniae* dan tiosulfat-sitrat-empedu-sukrosa (TCBS) serta uji biokimia sederhana.²⁸ Hasil identifikasi bakteri uji dapat dilihat pada tabel 2 dan 3 berikut ini:

Tabel 2. Hasil Identifikasi Bakteri Uji *S. pneumoniae* (Data Primer, 2014)

No	Metode Uji	Karakterisasi	Hasil
1.	Pewarnaan Gram	Bakteri berbentuk diplokokus gram positif, berbentuk lanset atau tersusun seperti rantai, dan berwarna ungu	+
2.	Kultur pada media agar darah	koloni bulat yang kecil, awalnya berbentuk kubah dan kemudian timbul lekukan di bagian tengahnya dengan pinggiran yang meninggi serta bersifat α -hemolitik	+
3.	Uji Mannitol	Tidak terjadi fermentasi mannitol yang ditandai oleh tidak adanya perubahan warna	+

Keterangan : (+) = Sesuai dengan karakteristik *S. pneumoniae*
 Uji gula manitol bertujuan untuk untuk melihat kemampuan bakteri dalam memfermentasikan manitol. Hasil identifikasi bakteri dengan uji ini menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media dari merah menjadi kuning, artinya bakteri uji tidak membentuk asam dari fermentasi manitol. Hal ini sesuai dengan sifat *Streptococcus pneumoniae* yang tidak dapat memfermentasikan manitol.¹⁹

Tabel 3. Hasil Identifikasi Bakteri Uji *V. cholerae* (Data Primer, 2014)

No	Metode Uji	Karakterisasi	Hasil
1.	Pewarnaan Gram	Bakteri berbentuk batang bengkok dan berwarna merah	+
2.	Kultur pada media TCBS	Koloni bakteri berwarna kuning berkilau (<i>yellow, shiny colonies</i>), tanpa koloni hijau atau biru-hijau pada medium yang sama	+
3.	Uji TSIA	Lereng kuning (asam) , dasar asam (kuning), H ₂ S (-), dan gas (-)	+
4.	Uji Karbohidrat	Memfermentasi glukosa (+), dan sukrosa (+), gas (-)	+
5.	Indole	Positif	+
6.	Voges Proskauer	Positif	+
7.	Citrate	Positif	+
8.	Motilitas	Motil	+

Keterangan : (+) = Sesuai dengan karakteristik *V. cholerae*

Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode *Disc Diffusion* Kirby-Bauer *Vibrio cholerae*

Uji aktivitas antibakteri dilakukan melalui beberapa tahapan meliputi peremajaan bakteri uji, pembuatan suspensi bakteri uji, pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol akar pepaya, serta persiapan kontrol positif (tetrasiklin) dan kontrol negatif (DMSO 10%). Bakteri yang akan diuji diremajakan terlebih dahulu dengan tujuan untuk memperoleh bakteri yang aktif. Bakteri dari kultur murni diremajakan pada media NA (*Nutrient agar*) dengan *enrichment* NaCl 2%. Proses peremajaan bakteri ini sangat erat kaitannya dengan siklus pertumbuhan bakteri, karena bakteri yang digunakan untuk pengujian sebaiknya adalah bakteri yang berada pada fase logaritmik, dimana jumlah bakteri yang meningkat terjadi secara eksponensial. Fase ini berlangsung 18-24 jam. Pada pertengahan fase ini pertumbuhan bakteri sangat ideal, dimana pembelahan terjadi secara maksimal.²⁹

Kontrol negatif yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri ini adalah *dimethylsulfoxide* (DMSO) 10% karena merupakan pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak dalam pembuatan variasi konsentrasi

larutan uji. *Dimethylsulfoxide* merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar.³⁰ Pelarut yang digunakan untuk melarutkan larutan uji harus bersifat negatif atau tidak menimbulkan daya hambat terhadap bakteri sehingga respon kematian bakteri benar-benar berasal dari larutan uji yang digunakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontrol negatif tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Vibrio cholerae* yang ditandai dengan tidak adanya zona hambat di sekitar kertas cakram. Hal ini berarti DMSO merupakan pelarut ekstrak yang baik karena dapat melarutkan tanpa memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri uji. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Assidqi *et al.* (2012) bahwa DMSO yang digunakan untuk melarutkan ekstrak etanol daun patikan kebo (*Euphorbia hirta*) dengan konsentrasi 10% tidak memiliki aktivitas antibakteri.³⁰

Tetrasiklin 30 µg digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan antibiotik pilihan yang sensitif terhadap bakteri *V. cholerae*. Kontrol positif tetrasiklin memberikan hasil daerah hambat sebesar 34 mm (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa tetrasiklin masih sensitif terhadap *V. cholerae*. Hasil ini diinterpretasikan berdasarkan tabel interpretasi zona hambat antibiotik. Tetrasiklin dikatakan sensitif jika zona hambat yang dihasilkan ≥ 19 mm, intermediet 15 - 18 mm, dan resisten ≤ 14 mm.^{31,33}

Tabel 4 Aktivitas Kontrol Positif dan Kontrol Negatif terhadap *Vibrio cholerae* setelah Inkubasi 24 Jam dengan tetrasiklin (Data Primer, 2014)

	Diameter Zona Hambat (mm)
	<i>V. cholerae</i>
Kontrol (+)	34 mm

Pembuatan variasi konsentrasi uji dilakukan dalam beberapa tahapan yang terdiri dari pembuatan larutan stok 1000 mg/mL dan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol akar pepaya. Sebelumnya dilakukan uji pendahuluan untuk memperoleh gambaran konsentrasi yang akan digunakan pada uji sebenarnya. Konsentrasi larutan uji yang digunakan untuk uji pendahuluan meliputi 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, dan

200 mg/mL ekstrak etanol akar pepaya yang dilarutkan dalam larutan DMSO 10% sebagai konsentrasi terkecil.

Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa dari konsentrasi 50 mg/mL hingga 200 mg/mL tidak terbentuk zona hambat terhadap *V. cholerae*, sehingga dilakukan penambahan dosis konsentrasi larutan uji mulai dari 400 mg/ml, hingga 1000 mg/mL. Penambahan dosis ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi yaitu konsentrasi 400 mg/mL, 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, dan 1000 mg/mL. Hasil uji pendahuluan setelah dilakukan penambahan dosis konsentrasi pada *V. cholerae* terbentuk zona hambat pada konsentrasi 900 mg/ml dan 1000 mg/ml (Tabel 5) Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan uji pada *V. cholerae* dengan konsentrasi 900 mg/mL dan 1000 mg/ml serta kontrol (+) dan kontrol (-) sebanyak 6 kali pengulangan. Hasil yang diperoleh tidak terbentuk zona hambat (Tabel 4.8).

Tabel 5. Hasil Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Akar Pepaya (Data Primer, 2014)

Konsentrasi Ekstrak	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>V. cholerae</i>	
50 mg/mL	0 mm	
100 mg/mL	0 mm	
150 mg/mL	0 mm	
200 mg/mL	0 mm	
400 mg/mL	0 mm	
500 mg/mL	0 mm	
600 mg/mL	0 mm	
700 mg/mL	0 mm	
800 mg/mL	0 mm	
900 mg/mL	14 mm	
1000 mg/mL	22 mm	

Keterangan : 0 = tidak ada zona hambat

Tabel 6. Hasil Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Akar Pepaya (Data Primer, 2014)

Konsentrasi Ekstrak	Diameter Zona Hambat (mm) <i>V. cholerae</i>					
	I	II	III	IV	V	VI
Pengulangan						
900 mg/mL	0	0	0	0	0	0
1000 mg/mL	0	0	0	0	0	0

Keterangan : 0 = tidak ada zona hambat

Uji pada *V. cholerae* diperoleh zona hambat pada konsentrasi 900 mg/mL dan 1000 mg/mL, maka dilakukan pengulangan sebanyak enam kali tetapi tidak diperoleh zona hambat. Hal ini diduga dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti faktor biologis dan faktor teknis. Faktor teknis sebagian besar dapat dikendalikan oleh peneliti namun faktor biologis tidak dapat dikendalikan oleh peneliti.³³ Faktor biologis terdiri atas *persisters* dan resistensi.³³ *Persisters* berasal dari sel-sel yang dorman atau bereplikasi dengan lambat sehingga tidak dapat dibunuh oleh zat antibakteri. Faktor *persisters* sudah dikendalikan dengan penggunaan inokulum pada fase logaritmik yaitu 18-24 jam. Pada fase ini bakteri sedang aktif membelah. Faktor biologis berikutnya adalah resistensi. Bakteri sangat mungkin untuk menjadi resisten selama pengujian antibakteri karena resistensi merupakan adaptasi yang dilakukan bakteri secara alami untuk tetap bertahan hidup.³⁴ Brooks *et al.* (2008) juga menyatakan bahwa aktivitas antibakteri dipengaruhi beberapa faktor yaitu konsentrasi ekstrak, kandungan senyawa antibakteri, daya difusi ekstrak, dan jenis bakteri yang dihambat.²⁸

Faktor teknis terdiri atas fase pertumbuhan, besar inokulum, pH, lama inkubasi, suhu lingkungan, dan medium yang digunakan. Besarnya inokulum sudah disesuaikan dengan standar Mc. Farland 0,5 atau setara dengan jumlah 1×10^8 bakteri/mL serta telah dikonfirmasi menggunakan spektrofotometri. Medium yang digunakan untuk pengujian dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer* adalah medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang merupakan media pertumbuhan bakteri untuk uji kepekaan yang direkomendasikan oleh CLSI.³³

Ketahanan suatu bakteri terhadap senyawa antibakteri berkaitan erat dengan struktur dinding selnya. Dinding sel pada bakteri berfungsi sebagai pelindung terhadap lingkungan yang tidak aman, seperti osmolaritas ekstrim, zat kimia perusak, dan antibiotik.³⁵ *Vibrio cholerae* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki struktur selubung sel bakteri gram-

negatif berupa membran luar berupa suatu lapisan lipid ganda yang dijumpai pada organisme gram-negatif tetapi tidak pada gram-positif. Membran ini ditembus oleh porin, protein yang membentuk kanal yang menjadi akses hidrofilik ke membran sitoplasmik. Lapisan peptidoglikan bersifat unik pada bakteri dan lebih tebal pada organisme gram positif dibandingkan dengan organisme gram negatif. Membran luar bersama dengan peptidoglikan membentuk dinding sel.⁷

Membran terluar dinding sel bakteri gram negatif yang tepat diatas lapisan tipis peptidoglikan, memiliki suatu komponen yang disebut lipopolisakarida (LPS). Fungsi utama LPS adalah membantu pembentukan pelindung yang permeabel. Geometri dari LPS dan interaksi antar molekul-molekul LPS disekitar membatasi masuknya garam empedu, antibiotik, dan substansi-substansi toksik yang dapat membunuh atau melukai bakteri. Meskipun LPS bertugas dalam menciptakan barrier yang permeabel, membran terluar masih lebih permeabel dibandingkan membran plasma dan membiarkan jalur masuk molekul-molekul kecil seperti glukosa dan monosakarida lainnya. Hal ini disebabkan adanya protein-protein porin . Sebagian besar porin berkluster bersama mebuat suatu trimer di membran terluar, kanal sempitnya mengijinkan molekul-molekul kecil berukuran 600-700 dalton lewat.⁵⁶

G.2. *Streptococcus pneumoniae*

Uji aktivitas antibakteri dilakukan melalui beberapa tahapan meliputi peremajaan bakteri uji, pembuatan suspensi bakteri uji, pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol akar pepaya, serta persiapan kontrol positif (azithromycin) dan kontrol negatif (DMSO 10%). Bakteri yang akan diuji diremajakan terlebih dahulu dengan tujuan untuk memperoleh bakteri yang aktif. Bakteri dari kultur murni diremajakan pada media BA (*blood agar*). Proses peremajaan bakteri ini sangat erat kaitannya dengan siklus pertumbuhan bakteri, karena bakteri yang digunakan untuk pengujian sebaiknya adalah bakteri yang berada pada fase logaritmik, dimana

jumlah bakteri yang meningkat terjadi secara eksponensial. Fase ini berlangsung 18-24 jam. Pada pertengahan fase ini pertumbuhan bakteri sangat ideal, dimana pembelahan terjadi secara maksimal.²⁸

Azithromycin 15 ug/disk digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan antibiotik pilihan yang sensitif terhadap bakteri *Streptococcus pneumoniae*.^{21,33} Kontrol positif azithromycin memberikan hasil daerah hambat sebesar 31 mm (Tabel 7). Hal ini menunjukkan bahwa azithromycin masih sensitif terhadap *S. pneumoniae*. Hasil ini diinterpretasikan berdasarkan tabel interpretasi zona hambat antibiotik. Azithromycin dikatakan sensitif jika zona hambat yang dihasilkan ≥ 18 mm, intermediet 14 - 17 mm, dan resisten ≤ 13 mm.³³ Ukuran zona hambat yang sangat besar ini menunjukkan bahwa antibiotik azithromycin bersifat bakterisid, yaitu membunuh bakteri dan bukan hanya menghambat pertumbuhan bakteri.³⁶

Tabel 7. Aktivitas Kontrol Positif dan Kontrol Negatif terhadap *Streptococcus pneumoniae* Setelah Inkubasi 24 Jam dengan Antibiotik Azithromycin (Data Primer, 2014)

	Diameter Zona Hambat (mm)
	<i>S. pneumoniae</i>
Kontrol (+)	31 mm
Kontrol (-)	0 mm

Keterangan : 0 = Tidak ada zona hambat

Pembuatan variasi konsentrasi dilakukan dalam beberapa tahapan yang terdiri dari pembuatan larutan stok 1000 mg/mL dan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol akar pepaya. Sebelumnya dilakukan uji pendahuluan untuk memperoleh gambaran konsentrasi yang akan digunakan pada uji sebenarnya. Konsentrasi larutan uji yang digunakan untuk uji pendahuluan meliputi 50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, dan 200 mg/mL ekstrak etanol akar pepaya yang dilarutkan dalam larutan DMSO 10% sebagai konsentrasi terkecil.

Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa dari konsentrasi 50 mg/mL hingga 200 mg/mL tidak terbentuk zona hambat terhadap *S. pneumoniae*,

sehingga dilakukan penambahan dosis konsentrasi larutan uji mulai dari 400 mg/ml, hingga 1000 mg/mL. Penambahan dosis ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi yaitu konsentrasi 400 mg/mL, 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, dan 1000 mg/mL. Hasil uji pendahuluan setelah dilakukan penambahan dosis konsentrasi tetap tidak menunjukkan adanya zona hambat terhadap *S. Pneumoniae*. Berdasarkan hal tersebut, maka uji pada *S. pneumoniae* tidak dilanjutkan (tabel 8).

Tabel 8 Hasil Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Akar Pepaya (Data Primer, 2014)

Konsentrasi Ekstrak	Diameter Zona Hambat (mm)
	<i>S. pneumoniae</i>
50 mg/mL	0 mm
100 mg/mL	0 mm
150 mg/mL	0 mm
200 mg/mL	0 mm
400 mg/mL	0 mm
500 mg/mL	0 mm
600 mg/mL	0 mm
700 mg/mL	0 mm
800 mg/mL	0 mm
900 mg/mL	0 mm
1000 mg/mL	0 mm

Keterangan : 0 = tidak ada zona hambat

Bakteri gram positif normalnya memiliki dinding sel yang tebal dan umumnya disusun oleh peptidoglikan. Peptidoglikan pada bakteri gram positif berisi suatu jembatan antar peptida. Sebagian besar bakteri gram positif memiliki suatu lapisan protein-protein pada permukaan peptidoglikan dinding sel. Protein-protein ini terlibat dalam interaksi antara sel dan lingkungannya. Beberapa melekat secara nonkovalen dengan mengikat ke peptidoglikan, asam teikoik, dan reseptor-reseptor lainnya. Struktur dinding sel streptokoki grup A disusun oleh unit *N-acetylmuramic acid* dan *N-acetylglucosamine acid*. Dinding sel streptokoki grup A juga tersusun oleh beberapa protein struktural. Pada kelompok ini, protein-

protein M bertanggung jawab secara jelas dalam faktor-faktor yang diasosiasikan dengan resistensi terhadap fagositosis.²²

Hasil pemeriksaan skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar pepaya mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, fenol, steroid, saponin, glikosida, tanin, dan flavonoid. Berbagai hasil studi literatur menyatakan bahwa senyawa metabolit sekunder tersebut memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri. Namun, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol akar pepaya tidak mampu menghambat pertumbuhan *S. pneumoniae* dan *V. cholerae*. Hal ini diduga karena dari semua senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam akar pepaya, belum diketahui jenis senyawa mana yang paling bertanggung jawab sebagai antibakteri, sehingga belum dapat diketahui sifat kimianya. Sifat kimia tersebut sangat menentukan jenis pelarut dan cara isolasi yang terbaik untuk mendapatkan senyawa aktif yang terkandung dalam akar pepaya.

Ekstraksi senyawa aktif dari bahan tanaman tergantung pada jenis pelarut yang digunakan dalam prosedur ekstraksi. Etanol 70% *P* disarankan penggunaannya untuk pelarut yang dapat menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk simplisia oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia dalam Farmakope Herbal Indonesia tahun 2008. Meskipun pada skrining fitokimia terdapat hasil positif pada uji yang dilakukan, namun skrining tersebut hanya bersifat kualitatif sehingga tidak dapat diperkirakan berapa banyak jumlah senyawa yang terdapat dalam ekstrak uji yang berperan dalam hambatan pertumbuhan bakteri. Tidak adanya data mengenai uji aktivitas antibakteri akar pepaya ekstrak etanol pada penelitian sebelumnya maka tidak dapat dilakukan perbandingan. Selain itu, terdapatnya zona hambat pada ekstrak akar pepaya pada uji pendahuluan tersebut dapat juga terjadi karena efek DMSO dalam mempenetrasi jaringan, transpor membran, dan peningkatan efektivitas obat. DMSO sebagai penetrasi jaringan bekerja

bergantung pada perubahan konfigurasi yang reversibel pada protein ketika DMSO menggantikan air, sedangkan pada membran transpor, molekul-molekul non-ionisasi dengan berat molekul rendah ditransportasikan lewat kulit oleh DMSO.³⁶

Konstituen-konstituen fitokimia seperti alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, saponin dan beberapa bahan-bahan aromatik lainnya adalah metabolit-metabolit sekunder pada tanaman yang berfungsi dalam mekanisme pertahanan melawan invasi berbagai mikroorganisme, serangga, dan herbivora lainnya. Tanin mengikat prolin kaya protein dan mengintervensi sintesis protein.³⁷ Alkaloid merupakan senyawa basa yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara merusak dinding sel melalui komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri.³⁸ Pada penelitian ini menunjukkan bahwa alkaloid yang terkandung dalam ekstrak akar pepaya tidak dapat berperan sebagai antibakteri terhadap *S. pneumoniae* dan *V. cholerae*. Hal ini diduga disebabkan oleh jumlah senyawa alkaloid yang terkandung dalam akar pepaya tidak adekuat dalam menghambat pertumbuhan kedua bakteri tersebut. Senyawa fenol memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mendenaturasi protein dan mengganggu fungsi membran sel, sehingga sel menjadi lisis.^{28,38}

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol 70% akar pepaya adalah alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, glikosida dan tanin. Ekstrak etanol akar pepaya tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus pneumoniae* dan *Vibrio cholerae*.

DAFTAR PUSTAKA

1. United Nations Children's Fund. Pneumonia and diarrhoea tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. New York: UNICEF: 2012.
2. Mohammad A, Anna LL, Young AY, Young EK, Binod S, Brian M, Jhon C. The global burden of cholera. World Health Organization 2012;90:209-18.
3. Igor R, Cynthia BP, Zrinka B, Kim M, Harry C. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. World Health Organization 2008;86:321-416.
4. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Data dan informasi kesehatan: situasi diare di Indonesia. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2011.
5. Pusat Data dan Surveilans Epidemiologi. Jendela epidemiologi: pneumonia balita. Jakarta:Kementerian Kesehatan RI; 2010.
6. Centers for Disease Control and Prevention. Cholera: *Vibrio cholerae* infection. 2013 (Disitasi Juli 2013). Diunduh dari: <http://cdc.gov/cholera/>.
7. Katzung BG. Farmakologi dasar dan klinik. Ed ke-10. Jakarta: EGC; 2010.
8. Ray AW, Katherine TM, Kathi H, Patrick GAC, Michael Stein. Azithromycin and the risk of cardiovascular death. NEJM. 2012. Diunduh dari: <http://nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1003833>.
9. Food and Drug Administration. Azithromycin and the risk of cardiovascular death. 2013.
10. Wasas AD, Robin EH, Maurice Hockman. Correlation between erythromycin and azithromycin resistance in streptococcus pneumoniae. SAMJ. 2003;93(4).
11. World Health Organization (WHO). Acute respiratory infection. 2009. Diunduh dari: http://www.who.int/entity/vaccine_research/en.
12. Lian Xue, Kaihu Yao, Guilin Xie, Yuejie Zheng, Chuanqing Wang, Yunxiao Shang, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates that cause invasive disease among Chinese children. Clin Infect Dis. 2010; 50 (5): 741-44.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cholera-*Vibrio cholerae* infection. CDC. 2013. Diunduh dari: <http://cdc.gov/cholera/>.
14. Doughari JH, Elmahmood AM, Manzara S. Studies on the antibacterial activity of roots extracts of *Carica papaya* L. AJMR. 2007. Diunduh dari: <http://www.academicjournals.org/ajmr>.
15. Krishna KL, M Paridhavi, Jagruti AP. Review on nutritional, medicinal, and pharmacological properties of papaya (*Carica papaya* Linn.). NPR. 2008;7(4):364-73.
16. Awoite TM, Olorunfemi MF, Ajani AO, Oyelakin MO. Studies on fungi associated with post harvest spoilage of pawpaw *Carica papaya* fruit.

- IOSRJOURNALS 4 (serial online). 2013. Diunduh dari: <http://iosrjournals.org/iosr-jpbs/full-issue/vol4-issue6.pdf>.
17. Pavan GV, Kumar, SN Subrahmanyam. Phytochemical analysis, *in-vitro* screening for antimicrobial and antihelmintic activity of combined hydroalcoholic seed extracts of four selected folklore indian medicinal plants. SCHOLARSRESEARCHLIBRARY. 2013;5(1):168-76 (serial online).
 18. Sukmariah M, Kamianti A. Kimia kedokteran. Tangerang: Bina Rupa Aksara; 2010.
 19. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986, Sediaan Galenik, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
 20. Harborne, J. B, 1987, Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Penerbit ITB, Bandung.
 21. Sangi, M; Runtuwene, M.R.J; Simbala, H.E.I; Makang, V.M.A; 2008, Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara, *Chem. Prog.*, 1(1):47-53.
 22. Harborne, J. B, 2006, Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Penerbit ITB, Bandung.
 23. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, Farmakope Indonesia Ed IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
 24. Marliana, S.D; Suryanti, V; Suyono; 2005, Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi*, 3 (1): 26-31.
 25. Gupta, C; Garg, A; Gupta, S; 2010, Antimicrobial And Phytochemical Studies Of Fresh Ripe Pulp And Dried Unripe Pulp Of Mangifera Indica (Amchur), *Middle-East Journal Of Scientific Research*, 5(2): 75-80.
 26. World Health Organization (WHO). Manual for the laboratory identification and antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens of public health importance in the developing world. 2003.
 27. Vandeppitte J, J Verhaegen, K Engbaek, P Rohner, P Piot, CC Heuck. Prosedur laboratorium dasar untuk bakteriologi klinis. Ed ke-2. Jakarta: EGC. 2005.
 28. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope herbal indonesia. Ed ke-1. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 2008.
 29. Brooks, Geo F; Butel, Janet S; Morse, Stephen A., 2008, Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg, EGC, Jakarta.
 30. Assidqi K, Wahyu T, Setyawati S. Potensi antibakteri daun patikan kebo (*Euphoria hirta*) sebagai antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* secara in vitro. *Journal of Marine and Coastal Science*. 2012; 1(2): 113-24.
 31. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. Pennsylvania: CLSI; 2007; 27(1).

32. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard eleventh Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 2012; 32 (1).
33. Choffnes ER, David AR, Alison M. Antibiotic resistance. New York: The National Academic Press. 2010.
34. Jawetz M, Adelberg. Mikrobiologi kedokteran, Ed. Ke-23. 2007.
35. Brunton LL, John SL, Keith LP, Iain LOB, Donald KB. The pharmacological basis of therapeutic. Ed ke-11. California: McGraw-Hill's. 2005.
36. Stanley WJ, Robert H. Physical properties of dimethyl sulfoxide and its function in biological systems. New York: New York academy of sciences. 2003.
37. Murugan, J Albino W, M Murugan. Antimicrobial activity and phytochemical constituents of leaf extracts of cassia auriculata. *J Pharm Sci*. 2013;75:122-5.
38. Juliantina RF, Citra MDA, Nirwani B, Nurmasitoh T, Bowo ET. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen anti bakterial terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Jurnal Kedokteran dan kesehatan Indonesia*. 2009.