

UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK ETANOL RIMPANG TEMU GIRING (*CURCUMA HEYNEANA* VAL.) TERHADAP PERTUMBUHAN *ESCHERICHIA COLI* SECARA *IN VITRO*

Submitted : 20 April 2015

Edited : 10 Mei 2015

Accepted : 20 Mei 2015

Aditya Maulana Perdana Putra, Rustifah, Muhammad Arsyad

Akademi Farmasi ISFI Banjarmasin

E-mail : aditya.maulana.pp@mail.ugm.ac.id

ABSTRACT

Infection is a major problem that the world's attention. Infectious diseases have caused the death of over 13 million people worldwide every year, particularly in the developing countries such as Indonesia. One of the species of bacteria that cause infections are *Escherichia coli*. *Curcuma heyneana* rhizome (*Curcuma heyneana* Val.) is a plant that is often used as a traditional medicine to antibacterial. This study was intended to determine the antibacterial inhibition activity, and minimum inhibitory concentrations (MIC) from the usage of an ethanol extract in the *curcuma heyneana* rhizome (*Curcuma heyneana* Val.) for the growth of an *Escherichia coli* by in vitro.

Curcuma heyneana rhizome (*Curcuma heyneana* Val.) was extracted using maseration method with solvent ethanol. Each extracts identified the active compounds group consisting of flavonoids, saponins, curcumin, volatile oil, and tannins. This study was an experimental laboratoric by using the diffusion method with discs blank with 10 treatment groups concentration which are 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, positive control and negative control with three repetitions.

The phytochemical screenings analysis showed *curcuma heyneana* rhizome (*Curcuma heyneana* Val.) of ethanol extract containing flavonoids, saponins, curcumin, volatile oil, and tannins. Ethanol extract in the *curcuma heyneana* rhizome (*Curcuma heyneana* Val.) had an effectiveness in inhibiting the growth of an *Escherichia coli* by in vitro. Minimum inhibitory concentrations (MIC) from the usage of an ethanol extract in the *curcuma heyneana* rhizome (*Curcuma heyneana* Val.) for the growth of an *Escherichia coli* by in vitro is 12,5% with average inhibition zone 9,77 mm. The results showed that the ethanol extract *curcuma heyneana* rhizome (*Curcuma heyneana* Val.) had an effectiveness in inhibiting the growth of an *Escherichia coli*, it showed inhibition zone diameter due to higher concentrations of the resistance is increasing. Analysis of the test data with Kruskal-Wallis (sig) = 0,001 which is smaller than $\alpha < 0,05$. It means that there are significant differences in the average diameter of an each concentration of ethanol extract of *curcuma heyneana* rhizome in inhibiting (*Curcuma heyneana* Val.) the growth of *Escherichia coli* by in vitro.

Keywords : Antibacterial, *Curcuma heyneana* rhizome (*Curcuma heyneana* Val.), Minimum inhibitory concentrations.

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan masalah besar yang menyedot perhatian dunia. Penyakit infeksi telah menyebabkan kematian sebesar 13 juta orang di seluruh dunia setiap tahun, terutama di negara-negara yang sedang berkembang seperti Indonesia. Salah satu dari spesies bakteri penyebab infeksi adalah *Escherichiacoli*. *Escherichia coli* merupakan bagian dari flora saluran cerna yang normal pada manusia, tetapi juga merupakan penyebab umum infeksi saluran kemih, diare, dan penyakit lainnya¹.

Sebuah penelitian di India mengemukakan bahwa sejumlah obat antibakteri

yang mulai resisten terhadap jenis bakteri ini. Menurut Okoli² melakukan penelitian resistensi bakteri *Escherichia coli* pada beberapa antibakteri, dengan cara memberi antibakteri pada ayam yang diinfeksi oleh *Escherichiacoli*. Hasilnya menunjukkan bahwa bakteri ini sudah cukup resisten terhadap *ampicillin*, *cotrimoxazole*, dan *nalidixic acid*. Beda lagi menurut Olson dkk.³ yang meneliti resistensi antibakteri pada *Escherichiacoli* yang diisolasi dari urin. Mahasiswa dengan riwayat infeksi saluran kemih 11,8% resistensi terhadap ciprofloxacin dan sebanyak 1.8% yang resisten terhadap

ciprofloxacin tanpa riwayat infeksi saluran kemih.

Temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) banyak ditemukan tumbuh liar di hutan-hutan kecil atau peladangan dekat rumah penduduk, terutama di kawasan Jawa Timur⁴. Rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) mengandung senyawa kurkumin yang dapat memberi warna kuning, minyak atsiri 0,8-3%, amilum, damar, lemak, tanin, saponin dan flavonoid⁵. Berdasarkan hasil penelitian Meilisa⁶ formulasi dalam sediaan kapsul dari ekstrak etanol rimpang temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza*, Roxb.) yang memiliki suku yang sama dengan rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) yaitu *Zingiberaceae*

BAHAN DAN METODE

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bejana untuk maserasi, *Paper disc*/Cakram, inkubator, pipet volume, jarum ose, lampu bunsen, *autoklaf*, cawan petri, gelas ukur, timbangan analitik, pinset, pelekat label, pisau, tabung reaksi, mikro pipet, *waterbath*, *hot plat*, *luminary air flow*.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang temu giring, aquades steril, media mueller hinton, eEtanol 96 %, biakan *Escherichia coli*, paper disk kosong, seftriakson, HCl pekat, serbuk Mg, FeCl₃, H₂SO₄ pekat, asam borat, kalium bikromat.

Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini dimulai pada bulan Maret sampai Juni 2014. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Biologi Akademi Farmasi ISFI Banjarmasin, Laboratorium FKIP MIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin, Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru dan Laboratorium Bakteriologi Balai Veteriner Banjarbaru.

Metode Pengumpulan Sampel

Temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) yang diambil dari Desa Pengaron dideterminasi di Laboratorium Biologi FKIP MIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin.

Ekstraksi Rimpang Temu Giring

Temu giring yang sudah di ambil kemudian di keringkan. Temu giring yang sudah

mengandung senyawa diantaranya kurkumin, saponin, flavonoid dan minyak atsiri yang berkhasiat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Berdasarkan uraian di atas peneliti tertarik untuk melakukan penelitian uji daya hambat ekstrak etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*. Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu “Apakah ekstrak etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) memiliki aktivitas daya hambat terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*?” dan “Berapa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*?”

kering tersebut kemudian diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Merendam serbuk simplisia rimpang temu giring selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Lakukan proses penyaringan menggunakan kertas saring untuk memisahkan maserat dengan ampas. Mengulangi proses penyarian sampai sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama hingga kandungan pada simplisia tertarik semua. Proses penyarian dikatakan selesai jika warna pelarut yang digunakan kembali seperti semula. Mengumpulkan semua maserat kemudian menguapkannya dengan menggunakan *vacum rotary evaporator*. Setelah maserat diuapkan dengan *vacum rotary evaporator*, diuapkan kembali dengan *water bath* untuk memperoleh ekstrak kental rimpang temu giring.

Skrining Fitokimia

Sebelum dilakukan pengambilan data penelitian, dilakukan skrining fitokimia. Skrining fitokimia yang dilakukan yaitu skrining flavonoid, saponin, tanin, kurkumin, dan minyak atsiri.

Pembuatan Media Mueller Hinton

Timbang Mueller Hinton Agar sebanyak 34 gram, kemudian campurkan dengan aquadest sampai 1000 ml dalam beker glass, aduk sampai larut. Larutan tersebut kemudian disterilkan di *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit⁷.

Pembuatan ekstrak etanol Rimpang Temu iring

Konsentrasi ekstrak etanol rimpang temu giring yang digunakan yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56, dan 0,78%. Kontrol positif yaitu seftriakson dengan dosis 200 mg yang dilarutkan dalam 200 ml aquades steril. Kontrol negatif yaitu aquades steril.

Prosedur Uji Daya Hambat

Masukkan 15 mL media ke dalam cawan petri bersama 1 mL suspensi *E.coli*. Homogenkan biakan bakteri dengan cara memutar ke kanan dan ke kiri lalu diamkan sampai padat. Kertas cakram di celupkan ke dalam berbagai ekstrak etanol rimpang temu giring, kontrol positif dan kontrol negatif. Letakkan cakram di atas media agar. Kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam amati dan ukur diameter zona hambat. Lakukan replikasi 3 kali.

Analisis Data

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Giring

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah temu giring (*Curcuma heyneana* Val.). Bagian tanaman temu giring yang digunakan adalah bagian rimpangnya yang sudah tua atau berumur 8-10 bulan⁸, dimana proses metabolisme telah sempurna sehingga diharapkan kandungan zat aktifnya juga maksimal. Pembuatan ekstrak etanol rimpang temu giring dilakukan dengan metode maserasi. Pemilihan metode maserasi karena dapat menarik senyawa-senyawa yang berkhasiat, baik yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Selain itu pengerjaan dan peralatan yang digunakan dalam metode maserasi sederhana dan

Data yang diperoleh diameter zona hambat yang didapat dari berbagai perlakuan dan disajikan dalam bentuk tabel. Data tersebut diuji untuk melihat diameter data terdistribusi normal dan homogen dengan uji Normality dan Uji Homogeneity. Jika data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen di uji dengan uji parametrik One Way Anova dilanjutkan dengan Post-Hoc Analysis. Jika data yang diperoleh salah satunya tidak terdistribusi normal dan homogen di uji dengan uji Non parametrik Kruskal Wallis dilanjutkan dengan uji Mann Whitney.

mudah diusahakan. Hasil ekstraksi maserasi menunjukkan bahwa tanaman rimpang temu giring dengan berat simplisia 1000g menghasilkan ekstrak kental dengan rendemen sebesar 11,04%. Hal tersebut sesuai dengan teori bahwa rimpang temu giring menghasilkan ekstrak dengan rendemen lebih dari 8%⁹.

Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Rimpang Temu Giring

Skrining fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid, saponin, tanin, kurkumin dan minyak atsiri dalam ekstrak kental rimpang temu giring. Hasil skrining fitokimia untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 1 di bawah.

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia

No.	Pengujian	Hasil	Keterangan
1.	Flavonoid Sampel + HCl pekat + serbuk Mg	+	Jingga dan Hijau ¹⁰
2.	Saponin Sampel + aquadest kocok selama 10 menit + HCl 2 N	+	Buih setinggi 3 cm + HCl 2 N, buih tidak hilang ¹¹
3.	Tanin Sampel + FeCl ₃ 0,5 M + H ₂ SO ₄ pekat	+	Biru kehitaman, + H ₂ SO ₄ pekat endapan coklat ¹²
4.	Kurkumin Sampel + asam borat	+	Kompleks warna merah ¹³
5.	Minyak Atsiri Sampel diuapkan sampai kering + etanol uapkan lagi sampai kering	+	Berbau khas ¹⁴

Selain skrining fitokimia juga dilakukan identifikasi keberadaan etanol, karena dikhawatirkan ekstrak kental rimpang temu giring masih mengandung etanol yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga akan mempengaruhi hasil uji. Pada identifikasi keberadaan etanol dalam ekstrak, tidak tercium aroma etanol yang spesifik, hanya tercium bau rimpang temu giring. Penambahan kalium bikromat dan asam sulfat pekat akan memberikan

warna hijau menunjukkan hasil positif. Reaksi oksidasi alkohol dengan kalium bikromat dan asam sulfat pekat akan menghasilkan warna hijau dari ion Cr³⁺¹⁵. Ekstrak yang telah ditambahkan kalium bikromat dan asam sulfat pekat tidak memberikan warna hijau (ekstrak tetap berwarna kuning jingga), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kental rimpang temu giring sudah tidak mengandung etanol.

Uji Daya Hambat Antibakteri

Pengujian daya hambat antibakteri pada *Escherichia coli* secara *in vitro* dilakukan dengan metode difusi cakram yaitu penentuan daya hambat antibakteri dilihat berdasarkan diameter zona hambat yang muncul disekitar cakram yang berisi zat antibakteri. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat jernih yang mengelilingi cakram diukur sebagai nilai kekuatan hambat obat terhadap bakteri uji. Artinya semakin luas zona hambat yang terbentuk menunjukkan semakin efektif zat tersebut sebagai antibakteri.

Uji daya hambat ini dilakukan pada 10 kelompok uji yang terdiri dari ekstrak rimpang temu giring dengan berbagai konsentrasi (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56% dan 0,78%), kontrol positif (seftriakson 30µg) dan kontrol negatif (aquadest). Pada penelitian ini replikasi dilakukan sebanyak 3 kali, sehingga data yang diperoleh sebanyak 30 data diameter zona hambatan. Hasil uji daya hambat ekstrak dengan variasi konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Dengan Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi Ekstrak %b/v	Diameter Zona Hambat (mm)			
	Disk 1	Disk 2	Disk 3	Rata-rata
100%	14,4	15,0	15,5	14,97
50%	14,0	14,1	14,1	14,07
25%	12,5	12,4	12,5	12,47
12,5%	9,8	9,8	9,7	9,77
6,25%	8	8	8	8
3,12%	8	8	8	8
1,56%	8	8	8	8
0,78%	8	8	8	8
Kontrol Positif (Seftriakson)	31,3	31,1	31,5	31,3
Kontrol Negatif (Aquadest)	8	8	8	8

Hasil uji daya hambat antibakteri ekstrak rimpang temu giring terhadap *Escherichia coli* (Tabel 2) menunjukkan bahwa konsentrasi 100%, 50%, 25% dan 12,5% memberikan diameter zona hambat, sedangkan konsentrasi 6,25%, 3,12%, 1,56% dan 0,78% tidak memberikan zona hambat disekitar *paper disk*. Tabel diatas memperlihatkan bahwa diameter zona hambat tertinggi diperoleh pada konsentrasi 100%. Kenaikan diameter zona hambat berbanding lurus dengan konsentrasi. Semakin besar konsentrasi maka diameter zona hambat yang dihasilkan juga semakin besar. Hal ini disebabkan karena kuantitas komponen aktif yang bersifat sebagai antibakteri semakin banyak dengan semakin tingginya konsentrasi ekstrak, sehingga kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* juga semakin besar.

Menurut Kurniawan¹⁶ dalam Hidayati¹⁷ menyatakan bahwa bila kecepatan daya hambat antibakteri dari sampel ke dalam medium lebih rendah dari pada kecepatan pertumbuhan bakteri, maka peningkatan konsentrasi tidak akan

meningkatkan penghambatan pada pertumbuhan. Saat tingkat konsentrasi ekstrak rimpang temu giring tinggi, ekstrak tersebut akan menjadi kental, membuat laju difusi senyawa aktif menjadi berkurang. Oleh karena itu pada konsentrasi 100% dan 50% diameter zona hambat rata-rata yang diperoleh memiliki perbedaan yang sangat sedikit dibandingkan dengan konsentrasi 50% dan 25%.

Analisis Data

Data diameter zona hambat yang diperoleh dari berbagai kelompok perlakuan dilakukan analisis normalitas dan homogenitas untuk menentukan uji yang digunakan apakah parametrik atau non parametrik. Uji normalitas data dilakukan dengan uji Shapiro-Wilk karena uji Shapiro-Wilk digunakan untuk sampel yang jumlahnya sedikit (kurang atau sama dengan 50) (Dahlan, 2013). Pada uji Shapiro-Wilk didapatkan signifikansi < 0,05 maka diambil kesimpulan bahwa distribusi data tidak normal. Hasil uji normalitas bisa dilihat pada tabel 3 di bawah.

Tabel 3. Uji Normalitas

Konsentrasi		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Diameter Zona Hambat	100%	0,997	3	0,900
	50%	0,750	3	0,000
	25%	0,750	3	0,000
	12,5%	0,750	3	0,000
	Kontrol Positif	1,000	3	1,000

Selanjutnya data diuji homogenitasnya dengan menggunakan *Levene Test*, diperoleh nilai signifikansi $< 0,05$ (0,005) yang menyatakan bahwa distribusi data tidak homogen. Menurut Dahlan (2013) syarat melakukan uji ANOVA untuk >2 kelompok tidak berpasangan adalah distribusi data harus normal dan varians data harus sama. Sedangkan data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan tidak homogen. Jika variabel hasil tidak terdistribusi normal atau varians tidak sama, maka alternatifnya dipilih Kruskal-Wallis.

Data diuji dengan Kruskal-Wallis untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara kelompok perlakuan. Uji Kruskal-Wallis diperoleh nilai $< 0,05$ (0,001) sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima (Lampiran 15), yang berarti terdapat aktivitas daya hambat ekstrak etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*. Maka dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat perbedaan diameter zona hambat diantara 10 kelompok perlakuan. Ringkasan hasil uji Kruskal-Wallis dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Ringkasan Hasil Uji Kruskal-Wallis

Diameter Zona Hambat	
Chi-Square	28.875
Df	9
Asymp.Sig.	0,001

Menurut Dahlan (2013) Mann-Whitney U Analysis digunakan untuk menentukan pada kelompok mana terdapat perbedaan yang

bermakna antar kelompok perlakuan dari uji non parametrik. Berikut ringkasan hasil Mann-Whitney U Analysis :

Tabel 5. Ringkasan Hasil Analisis Mann-Whitney U

Kelompok Uji	Nilai Signifikansi									
	100 %	50%	25%	12,5 %	6,25 %	3,12 %	1,56 %	0,78 %	Kontrol Positif	Kontrol Negatif
100%	-	0,046	0,046	0,046	0,037	0,037	0,037	0,037	0,050	0,037
50%	0,046	-	0,043	0,043	0,034	0,034	0,034	0,034	0,046	0,034
25%	0,046	0,043	-	0,043	0,034	0,034	0,034	0,034	0,046	0,034
12,5%	0,046	0,043	0,043	-	0,034	0,034	0,034	0,034	0,046	0,034
6,25%	0,037	0,034	0,034	0,034	-	1,00	1,00	1,00	0,037	1,00
3,12%	0,037	0,034	0,034	0,034	1,00	-	1,00	1,00	0,037	1,00
1,56%	0,037	0,034	0,034	0,034	1,00	1,00	-	1,00	0,037	1,00
0,78%	0,037	0,034	0,034	0,034	1,00	1,00	1,00	-	0,037	1,00
Kontrol Positif	0,050	0,046	0,046	0,046	0,037	0,037	0,037	0,037	-	0,037
Kontrol Negatif	0,037	0,034	0,034	0,034	1,00	1,00	1,00	1,00	0,037	-

Data diuji dengan Kruskal-Wallis untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara

kelompok perlakuan. Uji Kruskal-Wallis diperoleh nilai $< 0,05$ (0,001) sehingga H_0 ditolak

dan H₁ diterima, yang berarti terdapat aktivitas daya hambat ekstrak etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*. Maka dapat diambil kesimpulan

bahwa terdapat perbedaan diameter zona hambat diantara 10 kelompok perlakuan. Ringkasan hasil uji Kruskal-Wallis dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Ringkasan Hasil Uji Kruskal-Wallis

Diameter Zona Hambat	
Chi-Square	28.875
Df	9
Asymp.Sig.	0,001

Menurut Dahlan¹⁸ Mann-Whitney U Analysis digunakan untuk menentukan pada kelompok mana terdapat perbedaan yang bermakna antar

kelompok perlakuan dari uji non parametrik. Berikut ringkasan hasil Mann-Whitney U Analysis :

Tabel 7. Ringkasan Hasil Analisis Mann-Whitney U

Kelompok Uji	Nilai Signifikansi									
	100 %	50%	25%	12,5 %	6,25 %	3,12 %	1,56 %	0,78 %	Kontrol Positif	Kontrol Negatif
100%	-	0,046	0,046	0,046	0,037	0,037	0,037	0,037	0,050	0,037
50%	0,046	-	0,043	0,043	0,034	0,034	0,034	0,034	0,046	0,034
25%	0,046	0,043	-	0,043	0,034	0,034	0,034	0,034	0,046	0,034
12,5%	0,046	0,043	0,043	-	0,034	0,034	0,034	0,034	0,046	0,034
6,25%	0,037	0,034	0,034	0,034	-	1,00	1,00	1,00	0,037	1,00
3,12%	0,037	0,034	0,034	0,034	1,00	-	1,00	1,00	0,037	1,00
1,56%	0,037	0,034	0,034	0,034	1,00	1,00	-	1,00	0,037	1,00
0,78%	0,037	0,034	0,034	0,034	1,00	1,00	1,00	-	0,037	1,00
Kontrol Positif	0,050	0,046	0,046	0,046	0,037	0,037	0,037	0,037	-	0,037
Kontrol Negatif	0,037	0,034	0,034	0,034	1,00	1,00	1,00	1,00	0,037	-

SIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu:

1. Ekstrak etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* pada konsentrasi 100%, 50%, 25% dan 12,5% dengan rata-rata diameter zona hambat 14,97 mm, 14,07 mm, 12,47 mm, dan 9,77 mm

2. Konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak etanol rimpang temu giring (*Curcuma heyneana* Val.) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* yaitu 12,5% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 9,77 mm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner, T.A., 2012, *Jawetz, Melnick & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran Edisi 25*, diterjemahkan dari Bahasa Inggris oleh Nugroho, A.W., dkk, EGC, Jakarta, Indonesia.
2. Okoli, C, 2005, 'Anti Microbial Resistance Profile of E. coli Isolates from Tropical Free Range Chicken', *Online Journal of Health and Allied Sciences*, **4 (3)**: 2, viewed 30 March 2014, Available from: <http://www.ojhas.org/issue15/2005-3-3.htm>
3. Olson, R.P., Harrel, L.J., Kaye, K.S., 2009, 'Antibiotic Resistance in Urinary Isolates of Escherichia coli from College Women with Urinary Tract Infections' *American Society For Microbiology*, **53 (3)**: 1285-1286, viewed 4 March 2014. Available from: <http://aac.asm.org/content/53/3/1285.long>
4. Muhlisah, F., 2000, *Temu-temuan dan Empon-empon Budi Daya dan Manfaatnya*, Kinisius, Yogyakarta, Indonesia.
5. Santoso, H.B. 2008, *Ragam dan Khasiat Tanaman Obat*, Agro Media, Yogyakarta, Indonesia.
6. Meilisa. 2009. *Uji Aktivitas Antibakteri dan Formulasi Dalam Sediaan Kapsul Dari Ekstra Etanol Rimpang Tumbuhan Temulawak (Curcuma Xanthorrhiza, roxb) Terhadap Beberapa Bakteri*. Medan. Universitas Sumatera Utara.
7. Rahmatillah, M., 2014, 'Uji Daya Hambat Perasan Buah Jeruk Siam Banjar (*Citrus Reticulata*) Terhadap Pertumbuhan' Karya Tulis Ilmiah, Akademi Farmasi Isfi Banjarmasin.
8. Herawati, D., Nraida, L., dan Sumarno, *Cara Produksi Simplisia yang Baik*, ITB dan Seafast Center, Indonesia.
9. Depkes RI, 2009, *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 261/MENKES/SK/IV/2009 tentang Farmakope Herbal Indonesia Edisi Pertama*, Jakarta, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
10. Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., Kurniadi, B., 2006, *Buku Ajar Fitokimia*, Airlangga University Press, Surabaya, Indonesia.
11. Depkes RI, 1977, *Materia Medika Indonesia Jilid 1-4*, Jakarta, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
12. Sulastri, T. 2009, Analisis Kadar Tanin Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol pada Biji Pinang Sirih (*Areca cathecu L*), *Jurnal Chemica*, **10**: 59-63.
13. Sirait, M. 2007, *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*, ITB, Bandung, Indonesia.
14. Indriyani, L., Soetjipto, H., Sihasale, L., 2006, 'Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis L. vahl*) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina leach*', Salatiga, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana.
15. Sulistyawati, 2011, *Pemanfaatan Limbah Bonggol Pisang sebagai Bahan Baku Pembuatan Bioetanol sebagai Alternatif Energi Terbaru*, Yogyakarta, Universitas Negeri Yogyakarta.
16. Kurniawan, A., 2006, *Pengujian Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan secara In Vitro pada Ekstrak Herba Pegagan (Centella asiatica) Segar, Ekstrak Bubuk Kering dan Effervescent Pegagan*, Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya Malang cit.
17. Hidayati, N., 2009, 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Teh (*Camelia Sinesis L, v. assamica*) Tua Hasil Ekstraksi Menggunakan Pelarut Akuadest dan Etanol', Skripsi, Universitas Islam Negeri Malang, Malang.
18. Dahlan, M., S., 2013, *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*, Salemba Medika, Jakarta.