

AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI EKSTRAK ETANOL DAUN MAYANA JANTAN (*Coleus atropurpureus* Benth.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Klebsiella pneumoniae*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND BIOAUTOGRAPHIC OF MALE MAYANA LEAVES ETHANOLIC EXTRACT (*Coleus atropurpureus* Benth.) AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* AND *Klebsiella pneumoniae*

Shafanisa Alivia Azzahra¹, Ana Mardiyarningsih², dan Rima Munawaroh^{1*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Sukoharjo, Indonesia

²Program Studi D3 Farmasi, Politeknik Kesehatan Bhakti Setya Indonesia, Yogyakarta, Indonesia

*E-mail correspondence : rima.munawaroh@ums.ac.id

Abstrak

Infeksi merupakan masalah yang sulit diatasi oleh masyarakat, contoh bakteri yang dapat menginfeksi yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*. Selain pengobatan infeksi dengan antibiotik, sediaan herbal dapat menjadi alternatif pengobatan. Daun mayana jantan (*Coleus atropurpureus*) oleh masyarakat Halmahera Barat dimanfaatkan untuk meredakan nyeri, menyembuhkan bisul, batuk, luka, dan meningkatkan nafsu makan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun mayana jantan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*, serta untuk mengetahui senyawa aktif yang menyebabkan aktivitas antibakteri. Dilakukan uji identifikasi bakteri dengan pengecatan Gram dan metode biokimia, serta uji sensitivitas bakteri dengan metode difusi cakram. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran. Uji statistik dengan Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney, menunjukkan pada loading ekstrak 20 mg/sumuran memberikan aktivitas antibakteri terbesar untuk *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* dengan zona hambat masing-masing sebesar $12,2 \pm 0,3$ mm dan $11,3 \pm 0,3$ mm. Identifikasi senyawa menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak n-heksan:etil asetat (7:3 v/v), hasil uji menunjukkan ekstrak daun mayana jantan positif mengandung terpenoid, fenolik, flavonoid, dan triterpenoid. Senyawa aktif yang berperan sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* adalah fenolik (Rf = 0,24) dan triterpenoid (Rf = 0,68) berdasarkan uji bioautografi dengan metode kontak sedangkan senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* belum dapat ditentukan.

Kata Kunci: antibakteri, *Coleus atropurpureus*, KLT-Bioautografi, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Infection is a problem that is difficult to solve by the society, example of bacteria that can infect are *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. In addition to antibiotic treatment, herbal remedies can serve as an alternative treatment option. Male mayana leaves (*Coleus atropurpureus*) by people of West Halmahera are used to relieve pain, cure boils, cough, wounds, and increase appetite. The purpose of this study is to investigate the antibacterial activity of a 96% ethanol extract of male mayana leaves against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* bacteria, as well as to discover the active components that cause the antibacterial action. Bacterial identification tests were tested using Gram stain and biochemical methods, along with bacterial sensitivity testing using

the disc diffusion method. Antibacterial activity testing was conducted using diffusion well method. Statistical test with Kruskal-Wallis and Mann-Whitney, showed that the extract loads of 20 mg/well provided the greatest antibacterial activity for *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* with inhibition zones of 12, $2 \pm 0,3$ mm and 11, $3 \pm 0,3$ mm, respectively. Identification of compounds using the TLC method with silica gel 60 F₂₅₄ as stationary phase and n-hexane:ethyl acetate (7:3)v/v v/v as mobile phase, revealing that the male mayana leaf extract positively contains terpenoid, phenolic, flavonoid, and triterpenoids. The active compounds playing a role as antibacterials against *Pseudomonas aeruginosa* are phenolic ($R_f = 0.24$) and triterpenoids ($R_f = 0.68$), as determined by bioautography assay using the contact method. However, it is not possible to determine the antibacterial potential of compounds against *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: antibacterial, *Coleus atropurpureus*, TLC-Bioautography, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan proses dimana mikroorganisme masuk ke dalam tubuh dan berkembang biak, menyebabkan kerusakan jaringan (Signore, 2013). Infeksi bakteri dapat terjadi pada semua kalangan dan mempengaruhi berbagai sistem organ, infeksi yang sering terjadi adalah infeksi saluran pernapasan (27%) (Kronman *et al.*, 2014), infeksi kulit (7-10%) (Vinh & Embil, 2005), infeksi saluran pencernaan (5%) (Burd & Hinrichs, 2016), dan infeksi saluran kemih (0,7-0,9%) (Mireles *et al.*, 2015). Contoh bakteri yang dapat menginfeksi yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*.

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif yang menyebabkan infeksi seperti infeksi nosokomial, infeksi paru-paru kronis, dan infeksi pada individu dengan gangguan kekebalan tubuh. *Pseudomonas aeruginosa* menjadi salah satu bakteri yang paling mengancam jiwa oleh WHO pada tahun 2017 sebab pengobatan infeksiusnya terhambat oleh kemampuannya untuk melindungi diri (Thi *et al.*, 2020). Bakteri Gram negatif lainnya adalah *Klebsiella pneumoniae*, merupakan patogen yang menyebabkan *community-acquired pneumoniae* (CAP). *Klebsiella pneumoniae* pada manusia menyebabkan penyakit dengan memasuki sistem pencernaan dan kadang-kadang di nasofaring, kemudian berpindah ke aliran darah dan jaringan lain (Wang *et al.*, 2020).

Selain pengobatan infeksi bakteri dengan antibiotik, sediaan herbal juga dapat menjadi salah satu cara mengatasi infeksi bakteri. Penggunaan sediaan herbal sebagai pengobatan alternatif telah berkembang di kalangan masyarakat, sebanyak 70% sediaan herbal digunakan masyarakat, 20% obat herbal terstandar (OHT), dan 1,3% fitofarmaka. Tumbuhan herbal sangat membantu masyarakat dan terbukti dapat memberikan efek bagi kesehatan (Kautsar *et al.*, 2016). Salah satu tanaman yang bermanfaat adalah tanaman mayana jantan (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.), dapat digunakan sebagai obat tradisional terutama untuk mengatasi masalah infeksi, sehingga penggunaan mayana jantan untuk infeksi bakteri dapat membantu menurunkan angka resistensi antibiotik yang terjadi di kalangan masyarakat (Fauzi *et al.*, 2017).

Mayana jantan (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) secara ilmiah memiliki sinonim *Coleus atropurpureus* Benth. atau masyarakat lokal sering menyebutnya jawer kotok (Sunda); dhin khamandihan (Madura); si gresing (Batak); ati-ati, panci-panci, saru-saru (Bugis); miana, pilado

(Sumatera Barat); adang-adang (Palembang); iler, kentangan (Jawa); serewung (Minahasa); dan mayana (Manado). Daun mayana jantan berbentuk hati, dengan lekukan tipis beraneka warna di sekelilingnya yang disatukan dan dipegang oleh tangkai bunga. Tanaman ini tumbuh di daerah dataran rendah, dan biasa tumbuh sebagai tumbuhan liar di sekitaran sungai, sawah, dan tepi jalan pedesaan (Badrunasar & Santoso, 2016). Tanaman mayana jantan mengandung senyawa yang bermanfaat untuk meredakan nyeri, menyembuhkan bisul, batuk, luka, bibir pecah-pecah, wasir, dan meningkatkan nafsu makan. Aktivitas farmakologi yang ditemukan pada tanaman mayana jantan yaitu antibakteri, antiinflamasi, antifungi, antioksidan, antidiabetes, dan antihistamin (Wakhidah & Silalahi, 2018).

Berdasarkan penelitian Makatempuge & Lebang (2023), ekstrak etanol 96% daun mayana jantan memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas bakteri *Streptococcus mutans* dan *Salmonella typhimurium* dengan metode difusi sumuran. Ekstrak daun mayana jantan 40 mg/sumuran memiliki daya hambat terbesar pada pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Salmonella typhimurium* dengan zona hambat 26,67 mm dan 22,5 mm. Penelitian Nugraha *et al.*, (2022) menyatakan bahwa ekstrak etanol 96% daun mayana jantan memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan zona hambat paling besar pada *loading* ekstrak 4,5 mg/sumuran yaitu 2,92 mm dan 11,3 mm.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun mayana jantan terhadap bakteri yang berbeda dilakukan untuk memperluas penggunaan daun mayana jantan khususnya sebagai antibakteri. Uji bioautografi digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa kimia yang dapat memberikan efek antibakteri pada daun mayana jantan, sehingga dengan penelitian ini diharapkan mampu memberikan bukti ilmiah mengenai aktivitas antibakteri daun mayana jantan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*.

METODE PENELITIAN

Alat

Almari pengering, rotary evaporator (Heidolph®), oven (Memmert®), autoklaf (My Life®), inkubator (Memmert®), lemari pendingin (LG®), penangas air (Memmert®), *Laminar Air Flow* (Astari Niagara®), bejana maserasi, *shaking incubator* (New Brunswick Scientific®), lampu UV 254 dan 366 nm (Fiber®), mikroskop (Olympus®), blender (Miyako®), cawan porseline, timbangan analitik (Ohaus®), bunsen, mikropipet (Socorex®), *spreader glass*, *cork borer*, cawan petri (Iwaki®), jarum ose, *hot plate* (Thermo®), *magnetic stirrer*, pinset, pipa kapiler, penggaris (Butterfly®), dan alat-alat gelas.

Bahan

Daun mayana jantan diperoleh dari Desa Duwet, Klaten, Jawa Tengah. Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi UMS. Etanol 96%, *Lysine Iron Agar* (LIA) (Oxoid®), Dimetil Sulfoksida (DMSO) (Sigma®), *Motility Indole Ornithine* (MIO) (Himedia®), serbuk siprofloksasin, spiritus, akuades (Gibco®), NaCl 0,9% (Onitsuka®), McFarland (Remel®), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Oxoid®), *Brain Heart Infusion* (BHI) (Oxoid®), n-heksan (Supelco®), *Kligler Iron Agar* (KIA) (Oxoid®), minyak imersi (Merck®), etil asetat (Supelco®), plat silika gel 60 F₂₅₄ (Merck®),

pereaksi semprot (vanillin-asam sulfat, FeCl_3 5% (Merck®), Dragendorff, Sitroborat, Lieberman-Burchard), cat Gram A, B, C, dan D.

Determinasi Tanaman

Berdasarkan laporan nomor KM.04.02/XI.6/1454/2023 dari Laboratorium Pengujian-UPF Pelayanan Kesehatan Tradisional (Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar) menyatakan bahwa sampel tanaman segar (Gambar 1) yang diserahkan adalah *Coleus scutellarioides* (L.) Benth. dengan sinonim *Coleus atropurpureus* Benth. yang termasuk ke dalam famili Lamiaceae.



Gambar 1. Tanaman mayana jantan *Coleus atropurpureus* Benth.

Ekstraksi

Daun mayana jantan dipilih yang dewasa kemudian dicuci hingga bersih di bawah air mengalir dan ditiriskan, lalu sampel dikeringkan selama 24 jam pada suhu 50°C di dalam almari pengering, kemudian diserbukkan dengan cara diblender. Perbandingan 1:10 b/v digunakan dalam metode ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 96% (Kemenkes RI, 2017). Sebanyak 200 gram simplisia daun mayana dan 2000 mL etanol 96% dicampurkan ke dalam wadah maserasi, diaduk selama 5 menit setiap jam pada 6 jam pertama, kemudian dibiarkan 3x24 jam dengan pengadukan sesekali. Hasil maserasi disaring untuk menghasilkan filtrat 1 dan ampas, yang kemudian ampas direndam kembali dalam 2000 mL etanol 96% dan diamkan 3x24 jam (Nugraha *et al.*, 2022). Hasil remaserasi disaring dan menghasilkan filtrat 2. Filtrat 1 dan 2 digabungkan, dievaporasi pada suhu 50°C menggunakan *rotary evaporator*, dan ekstrak yang dihasilkan dikentalkan selama maksimal 24 jam dalam penangas air pada suhu 60°C (Makatempuge & Lebang, 2023).

Pembuatan larutan seri konsentrasi ekstrak

Sebanyak 800 mg ekstrak dilarutkan dengan 1 mL DMSO untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 80% b/v. Variasi konsentrasi ekstrak dibuat dengan pengenceran serial menjadi separuh konsentrasi semula. Larutan konsentrasi 80% diambil 0,5 mL dan dilarutkan dalam DMSO hingga 1 mL untuk memperoleh larutan konsentrasi 40%, demikian seterusnya hingga diperoleh larutan konsentrasi 10%. Konsentrasi ekstrak yang dibuat adalah 80%, 40%, 20%, dan 10%.

Pembuatan larutan kontrol positif

Sebanyak 10 mg siprofloksasin ditimbang kemudian dilarutkan dalam 50 mL DMSO untuk membuat larutan siprofloksasin $5\ \mu\text{g}/25\ \mu\text{L}$.

Uji identifikasi bakteri

Uji identifikasi yang pertama dilakukan secara mikroskopik pengecatan Gram. Preparat ditetesi minyak imersi di bagian atas dan diamati dengan perbesaran 1000x (Lay, 1994). Interpretasi hasil yaitu bakteri Gram positif akan berwarna ungu, sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah (Boleng, 2015). Uji identifikasi kedua dilakukan secara biokimiawi menggunakan beberapa media, yaitu KIA, LIA, dan MIO (Wulandari & Suryani, 2008).

Uji sensitivitas bakteri

Dilakukan dengan mempersiapkan media MHA, kemudian inokulasi dengan bakteri sebanyak 200 μ L dan ratakan menggunakan *spreader glass*, diamkan selama 10 menit. Letakkan beberapa disk antibiotik di atas media, kemudian posisikan petri dalam keadaan terbalik dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Amati ada tidaknya zona hambat pada daerah disk. Jika terdapat zona hambat, ukur diameternya dengan penggaris. Bandingkan hasilnya dengan zona hambat standar dari masing-masing antibiotik dan dipastikan apakah bakteri tersebut sensitif atau resisten terhadap antibiotik (Hayati *et al.*, 2012). Hasil uji sensitivitas digunakan untuk pemilihan kontrol positif pada uji aktivitas antibakteri.

Pembuatan suspensi bakteri

Kedua bakteri uji dibuat stok bakteri dengan metode *streak plate*, kemudian diambil 3-5 koloni yang terpisah pada kuadran IV, dan dimasukkan ke dalam 5 mL BHI steril kemudian bakteri diinkubasi selama 2-3 jam dengan suhu 37°C dan kecepatan 200 rpm di *shaking incubator*. Diambil suspensi bakteri 100 μ L dan masukkan ke dalam tabung reaksi kecil, kemudian dilakukan perbandingan kemiripan kekeruhan dengan standar McFarland. Larutan standar digojok terlebih dahulu, lalu diletakkan dan disejajarkan dengan larutan suspensi, dibelakangnya diletakkan kertas bergaris, kekeruhan dikatakan sama jika garis hitam di kertas sudah tampak sama. Jika suspensi bakteri terlalu keruh dibandingkan McFarland maka tambahkan NaCl steril. Kekeruhan yang sama dengan McFarland = $0,5 \times 10^8$ CFU/mL (Muljono *et al.*, 2016).

Uji aktivitas antibakteri

Metode difusi agar menggunakan sumuran sebanyak tiga kali pengulangan pada media MHA, dengan konsentrasi ekstrak 10%, 20%, 40%, dan 80%; DMSO sebagai kontrol negatif; dan siprofloksasin 5 μ g/sumuran sebagai kontrol positif. Bakteri yang telah distandarisasi 0,5 McFarland (10^8 CFU/mL) sebanyak 200 μ L diratakan pada media MHA dan didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit agar suspensi bakteri dapat berdifusi ke dalam media secara merata. Media dilubangi menggunakan *cork borer* nomor 3, lalu 25 μ L larutan uji dari setiap konsentrasi dan kontrol uji (positif dan negatif) dimasukkan ke sumuran, kemudian masukkan cawan petri ke inkubator bakteri selama 24 jam pada suhu 37°C (Makatempuge & Lebang, 2023). Ekstrak dengan konsentrasi 10%, 20%, 40%, dan 80% masing-masing dimasukkan sebanyak 25 μ L/sumuran sehingga *loading* ekstrak yang diujikan berturut-turut 2,5; 5; 10; dan 20 mg/sumuran.

Zona bening yang tampak setelah masa inkubasi bakteri diukur sebagai zona hambat. Pengukuran menggunakan penggaris dengan cara diukur diameter dari tepi ke tepi yang bersebrangan melintasi lubang sumuran. Ukuran diameter zona hambat ditetapkan sebesar 6 mm (diameter sumuran) jika tidak ada zona hambat di sekitar sumuran.

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan senyawa menggunakan plat silika gel 60 F₂₅₄ sebagai fase diam. Fase gerak dalam chamber adalah campuran n-heksan:etil asetat (7:3) v/v, dijenuhkan terlebih dahulu. Sampel ekstrak 80% yang telah ditotolkan sebanyak 1 totolan pada plat KLT dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama beberapa menit kemudian dimasukkan ke dalam chamber untuk dielusi dengan fase gerak. Setelah itu, plat diangkat dan dibiarkan mengering (Fauzi *et al.*, 2017). Plat yang telah dielusi diamati pada sinar tampak, sinar UV 254, dan sinar UV 366, serta pengamatan setelah menggunakan pereaksi semprot. Pereaksi semprot yang digunakan yaitu vanillin-asam sulfat untuk deteksi terpenoid, FeCl₃ 5% untuk mendeteksi fenolik, Dragendorff untuk mengetahui adanya alkaloid, sitroborat untuk deteksi flavonoid, dan Lieberman-Burchard untuk deteksi triterpenoid dan steroid (Wagner & Blatt, 1998). Pengamatan bercak meliputi jumlah bercak, warna bercak, dan perhitungan nilai Rf.

Uji bioautografi

Metode yang digunakan adalah metode kontak dengan cara menempelkan langsung plat KLT pada media MHA yang telah diinokulasi bakteri uji (Paputungan *et al.*, 2019). Sebanyak 200 µL suspensi bakteri diinokulasi ke media, dan plat KLT yang telah dielusi sebelumnya ditempelkan pada media selama 20 menit untuk memungkinkan senyawa aktif berdifusi ke dalam media. Plat KLT diambil dari media, dan cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator pada posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inkubasi diamati, jika terdapat zona hambat atau daerah bening maka nilai Rf dihitung. Plat KLT yang ditempelkan pada media MHA ada dua, yaitu plat yang telah ditotolkan ekstrak dan plat kosong yang hanya dielusi oleh fase gerak sebagai kontrol negatif.

Analisis data

Analisis statistik data diameter zona hambat berupa uji Saphiro-Wilk untuk menilai distribusi data, diperoleh nilai $P=0,000 < 0,05$ berarti data tidak terdistribusi normal (Malay, 2022). Uji homogenitas dengan Brown-Forythe dengan nilai $P < 0,05$ menunjukkan variansi data tidak homogen (Wang *et al.*, 2017). Uji Kruskal-Wallis digunakan karena data tidak terdistribusi secara normal dan tidak homogen, jika temuan menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik, maka dilakukan uji Mann-whitney (Kadir, 2015). Analisis statistik dengan tingkat kepercayaan 95% atau $\alpha=0,05$ menggunakan SPSS versi 25.

Hasil analisis KLT dibandingkan dengan informasi yang ditemukan dalam buku *Phytochemical Methods* dan *Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas*. Analisis hasil bioautografi dilakukan dengan menghitung nilai Rf zona bening yang tidak ditumbuhi bakteri pada media, kemudian dicocokkan dengan golongan senyawa hasil identifikasi secara KLT, sehingga dapat disimpulkan zona hambat yang terbentuk disebabkan oleh golongan senyawa apa (Qolbi & Yuliani, 2018).

HASIL DAN PEMBAHASAN

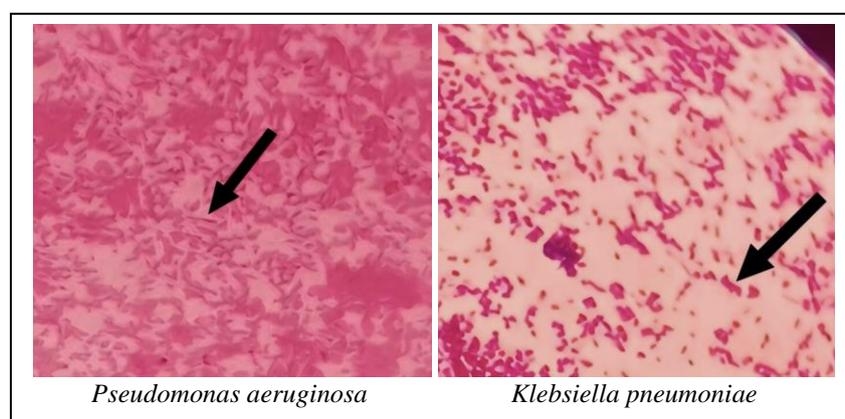
Ekstraksi daun mayana jantan

Hasil maserasi 200 gram daun mayana jantan didapatkan ekstrak kental 51,42 gram sehingga diperoleh rendemen ekstrak 25,71%. Dilakukan uji organoleptik ekstrak daun mayana jantan, sebagai pengenalan awal yang sederhana meliputi pengamatan terhadap warna, rasa, bau, dan bentuk. Data dapat digunakan untuk mengamati ekstrak selama waktu

simpan, jika terjadi perubahan tentu dapat mempengaruhi khasiatnya (Kartikasari *et al.*, 2015). Ekstrak yang diperoleh memiliki warna coklat gelap, rasa yang pahit, bau khas seperti herbal, serta bentuk yang lengket dan kental yang menandakan tingkat viskositasnya tinggi.

Hasil uji identifikasi bakteri

Uji identifikasi diawali dengan metode pengecatan Gram dari koloni bakteri yang akan diidentifikasi, bertujuan untuk menentukan golongan bakteri serta karakteristiknya berdasarkan hasil pengecatan (Kar, 2008). Berdasarkan hasil pengamatan dengan mikroskop pada perbesaran 1000x, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki bentuk batang dan berwarna merah, sedangkan bakteri *Klebsiella pneumoniae* memperlihatkan warna merah dengan bentuk batang bergerombol. Hasil pengecatan pada Gambar 2 menunjukkan jika kedua bakteri merupakan golongan Gram negatif. *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri Gram negatif dengan bentuk batang (Soedarto, 2015). Bakteri Gram negatif hanya berikatan dengan safranin, yang memberikan warna merah pada koloni ketika dilihat di bawah mikroskop. Bakteri ini juga mengandung lapisan peptidoglikan dengan tebal 10% dari seluruh struktur dinding sel bakteri, yang memungkinkannya untuk melepaskan pewarna kristal violet dengan mudah (Smith & Hussey, 2005).



Gambar 2. Hasil pengecatan Gram bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* pada perbesaran 1000x dengan karakteristik berbentuk batang dan berwarna merah

Uji identifikasi selanjutnya dilakukan secara biokimia, uji biokimia merupakan uji sifat metabolik atau enzimatik yang berguna untuk mengetahui jenis bakteri dalam merespon suatu zat (Soedarto, 2015). Media *Kligler Iron Agar* (KIA) mengidentifikasi bakteri berdasarkan kemampuan untuk memfermentasi gula dan produksi H_2S , kemampuan memfermentasi gula akan ditandai dengan warna kuning pada seluruh media dan positif produksi H_2S akan berwarna hitam. Media *Lysine Iron Agar* (LIA) digunakan untuk mendeteksi kemampuan bakteri untuk mendekarboksilasi lisin dan membentuk H_2S , hasil positif akan mengubah media menjadi ungu. Media *Motility Indole Ornithine* (MIO) untuk mengetahui sifat bakteri berdasarkan motilitasnya, produksi indol, dan aktivitas dekarboksilasi ornitin (Atlas, 2010).

Tabel 1. Hasil uji biokimia bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*

Bakteri	KIA*			LIA**			MIO***	
	Miring	Tegak	H ₂ S	Miring	Tegak	H ₂ S	Reaksi	Motility
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alkali (merah)	Alkali (merah)	-	Alkali (ungu)	Alkali (ungu)	-	Asam (Kuning)	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Asam (kuning)	Asam (kuning) + gas	-	Alkali (ungu)	Alkali (ungu)	-	Asam (Kuning)	-

Keterangan: * Hasil positif memfermentasi gula menunjukkan perubahan warna kuning pada media tegak

** Hasil positif dekarbosisasi lisin menunjukkan warna ungu pada media tegak

*** Hasil positif dekarboksilasi ornitin menunjukkan warna ungu pada media tegak

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan penelitian (Tabel 1), bakteri tidak dapat memfermentasi glukosa dan laktosa, dapat mendekarboksilase lisin secara cepat sehingga menyebabkan reaksi alkali, tidak ada warna hitam pada media maka bakteri tidak memproduksi H₂S, bakteri tidak dapat mendekarboksilase ornitin yang ditandai dengan warna kuning dengan ungu dibagian atas media, dan pergerakan bakteri (motilitas) positif dilihat dari kekeruhan pada media yang terbentuk akibat pertumbuhan bakteri yang keluar dari garis inokulasi. Karakteristik bakteri *Pseudomonas aeruginosa* telah sesuai menurut Parija (2012), bakteri *Pseudomonas aeruginosa* bersifat positif oksidase, nonfermentatif, memproduksi lisin dekarboksilase karena menghasilkan *cadaverine* (*pentameline diamine*) yang bersifat basa sehingga berwarna ungu, tidak memanfaatkan laktosa dan maltosa, motil, indol, dan H₂S negatif.

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada Tabel 1 menunjukkan glukosa dan laktosa dapat difermentasi, terdapat gas yang terbentuk ditandai dengan terangkatnya media dari dasar tabung, bakteri mendekarboksilase lisin secara cepat, tidak membentuk H₂S, hasil negatif untuk reaksi dekarboksilasi ornitin yang ditandai dengan warna kuning dengan ungu dibagian atas media, tidak ada pergerakan bakteri (nonmotil) dilihat dari pertumbuhan bakteri yang hanya pada garis inokulasi. Menurut Parija (2012), bakteri *Klebsiella pneumoniae* dapat memfermentasi sukrosa, glukosa, dan laktosa, memproduksi gas, lisin dekarboksilasi positif, dekarboksilasi ornitin negatif, negatif H₂S, negatif motil, dan negatif indol.

Hasil uji sensitivitas bakteri

Hasil uji sensitivitas bakteri dibandingkan dengan standar CLSI (2020). Pada beberapa antibiotik hanya terbentuk zona irradikal yaitu daerah di sekitar disk terlihat pertumbuhan yang kurang subur dibandingkan daerah lain, menunjukkan jika pertumbuhan bakteri dihambat tetapi tidak dimatikan (Jawetz *et al.*, 1995). Zona irradikal tidak dapat digunakan untuk mengukur potensi antibiotik, atau dapat dikatakan bakteri bersifat resisten terhadap antibiotik. Terhadap semua antibiotik yang diujikan semua bersifat resisten, hanya terhadap siprofloksasin (CIP) bakteri *Pseudomonas aeruginosa* bersifat intermediet dan *Klebsiella pneumoniae* bersifat sensitif sehingga antibiotik siprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif pada uji antibakteri (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil uji sensitivitas bakteri terhadap antibiotik (diinterpretasi menurut CLSI, 2020)

Bakteri	Diameter Zona Hambat (mm)* Antibiotik**						
	AMP 10 µg	C 30 µg	E 15 µg	VA 30 µg	TE 30 µg	CF 30 µg	CIP 5 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18 (irradikal)	6	9	6	25,5 (irradikal)	16,5 (irradikal)	18
Keterangan	Resisten	Resisten	Resisten	Resisten	Resisten	Resisten	Intermediet
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25,5 (irradikal)	29,5 (irradikal)	9,5	15 (irradikal)	7,5 (irradikal)	24 (irradikal)	32
Keterangan	Resisten	Resisten	Resisten	Resisten	Resisten	Resisten	Sensitif

Keterangan : *Zona hambat termasuk diameter disk = 6 mm

**AMP (Ampisilin), C (Kloramfenikol), E (Eritromisin), VA (Vankomisin), TE (Tetrasiklin), CF (Sefalotin), CIP (Siprofloksasin)

Hasil uji aktivitas antibakteri

Metode difusi sumuran digunakan dalam uji aktivitas antibakteri, dimana senyawa aktif akan berdifusi ke dalam media padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji (Nurhayati *et al.*, 2020). Penelitian menggunakan *loading* ekstrak 2,5; 5; 10; 20 mg/sumuran. Kontrol negatif menggunakan DMSO 100% yang terbukti tidak menghambat bakteri sehingga daya hambat yang terbentuk murni dari ekstrak yang diteliti (Fajriaty *et al.*, 2018). Kontrol positif menggunakan antibiotik siprofloksasin 5 µg/sumuran yang bersifat bakteristatik, pemilihan siprofloksasin didasarkan pada uji sensitivitas yang dilakukan sebelumnya dan terbukti dapat menghambat kedua bakteri uji.

Tabel 3 menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun mayana jantan semakin besar pula diameter zona hambat yang dihasilkan baik terhadap *Pseudomonas aeruginosa* maupun *Klebsiella pneumoniae*. Hal ini sesuai dengan penelitian Makatempuge & Lebang (2023) dan Nugraha *et al.*, (2022) yang menunjukkan adanya korelasi yang kuat antara konsentrasi ekstrak dengan zona hambat yang dihasilkan, dimana aktivitas antibakteri meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Kemungkinan dikarenakan pada konsentrasi tinggi senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri terdapat dalam jumlah banyak.

Tabel 3. Hasil zona hambat uji antibakteri ekstrak daun mayana jantan

Bakteri	Rata-rata diameter zona hambat ± SD (mm)*					
	Loading ekstrak (mg/sumuran)				K+	K-
	2,5	5	10	20	Siprofloksasin 5 µg/sumuran	DMSO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7±1,7	7,7±2,9	7,83±3,0	12,2±0,3	24,4±5,9	6,0±0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,2±2,0	7,5±2,6	7,7±2,9	11,3±0,3	43,8±2,0	6,0±0

Keterangan: * Zona hambat termasuk diameter sumuran = 6 mm

Hasil uji Kruskal-Wallis data diameter zona hambat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* menunjukkan nilai P masing-masing sebesar 0,018 dan 0,023 ($p < 0,05$) yang diartikan adanya perbedaan yang signifikan pengaruh perlakuan yang diberikan pada bakteri uji (Kadir, 2015). Analisis selanjutnya adalah Uji Mann-Whitney, yang digunakan untuk mengidentifikasi kelompok perlakuan mana yang memiliki efek yang sama dan yang berbeda. Diameter zona hambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* pada kontrol negatif tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) terhadap loading ekstrak 2,5; 5 dan 10 mg/sumuran, namun menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) jika dibandingkan dengan ekstrak 20 mg/sumuran dan kontrol positif siprofloksasin. Kontrol negatif yang digunakan tidak menunjukkan pengaruh terhadap terbentuknya zona hambat pada bakteri uji, maka ekstrak 2,5; 5 dan 10 mg/sumuran dikatakan tidak dapat memberikan dampak yang besar sebagai antibakteri. Jika dibandingkan dengan kontrol negatif dan berbagai konsentrasi ekstrak, kontrol positif siprofloksasin 5 μ g/sumuran menunjukkan perbedaan yang mencolok karena kontrol positif menghasilkan aktivitas antibakteri yang sangat tinggi dan konsisten. Variasi konsentrasi ekstrak kemudian dibandingkan satu persatu. Pada ekstrak 2,5; 5 dan 10 mg/sumuran tidak terlihat perbedaan yang signifikan, namun pada ekstrak 20 mg/sumuran menunjukkan perbedaan yang signifikan. Zona hambat yang dihasilkan secara konsisten dipengaruhi oleh ekstrak 20 mg/sumuran.

Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis adalah metode sederhana yang dapat memisahkan senyawa dengan prinsip memisahkan senyawa dalam sampel berdasarkan sifat polaritas antara sampel dengan fase gerak yang digunakan. Ekstrak dibuat dengan konsentrasi 80%. Ekstrak yang telah dielusi menunjukkan noda-noda yang tampak pada plat KLT (Tabel 4) yang bisa diartikan jika senyawa yang terkandung pada ekstrak dapat terpisah.

Tabel 4. Hasil uji KLT kandungan senyawa dalam ekstrak daun mayana Jantan menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak n-heksana:etil asetat (7:3 v/v)

No. bercak	Rf	Deteksi sebelum disemprot			Pereaksi dan deteksi	Deteksi setelah disemprot	Keterangan
		Vis	UV 254	UV 366			
1.	0,08	C	P-F	C	FeCl ₃ 5% (Vis)	U	Fenolik
		C	P-F	C	Sitroborat (UV 366)	F-K	Flavonoid
2.	0,2	C	P-F	C	Sitroborat (UV 366)	F-K	Flavonoid
3.	0,24	K	P-F	C	FeCl ₃ 5% (Vis)	U	Fenolik
4.	0,36	A	P-F	C	Vanilin-asam sulfat (Vis)	H	Terpenoid
5.	0,46	K	P-F	C	Vanilin-asam sulfat (Vis)	B	Terpenoid
6.	0,68	K	P-F	C	Lieberman- Burchard (UV 366)	F-M	Triterpenoid
7.	0,78	A	P-F	C	Vanilin-asam sulfat (Vis)	B	Terpenoid
8.	0,9	A	P-F	C	Vanilin-asam sulfat (Vis)	B	Terpenoid

Keterangan : Vis : visual/sinar tampak

C : Coklat

A : Abu

F-M : Fluoresensi-Merah

K : Kuning

H : Hijau

F-K : Fluoresensi-Kuning

U : Ungu

B : Biru

P-F : Pemadaman-Fluoresensi

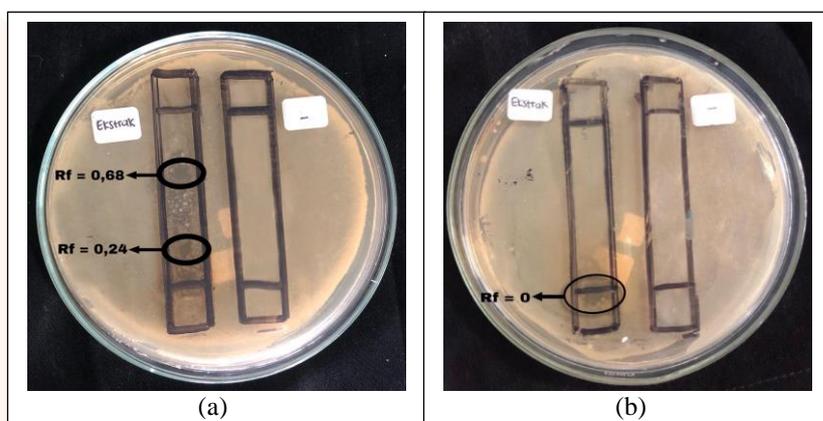
Kandungan senyawa fenolik dideteksi menggunakan pereaksi FeCl_3 5%, hasil positif menunjukkan warna noda menjadi hijau, ungu, biru, atau hitam (Harborne, 1998). Terbentuknya ikatan kovalen koordinasi antara ion besi (III) dan gugus OH fenolik ini yang menyebabkan terjadinya perubahan warna tersebut (Dayanti & Suyatno, 2012). Respon positif fenolik ditunjukkan dengan warna ungu di bawah sinar tampak pada nilai R_f 0,08 dan 0,24. Deteksi flavonoid menggunakan reagen sitroborat dengan respon positif flavonoid akan menunjukkan fluoresensi kuning-hijau pada UV 366 nm (Markham, 1988), hasil deteksi menunjukkan warna kuning pada sinar UV 366 nm dengan nilai R_f 0,08 dan 0,2.

Saat noda pada KLT disemprot dengan reagen vanillin-asam sulfat, noda akan berubah menjadi warna biru, hijau, merah, atau coklat pada sinar tampak, yang mengindikasikan adanya senyawa terpenoid (Wagner & Bladt, 1998). Diduga pada R_f 0,36; 0,46; 0,78; dan 0,9 merupakan senyawa terpenoid, dikarenakan pada keempat noda menunjukkan perubahan warna menjadi hijau dan biru yang dilihat pada sinar tampak. Reaksi triterpenoid dengan pereaksi Liebermann-burchard menghasilkan noda berwarna merah pada UV 366 nm (Harborne, 1998), karena H_2SO_4 dalam pelarut asam asetat anhidrida berinteraksi dengan molekul triterpenoid sehingga mampu menghasilkan warna (Sangi *et al.*, 2008). Pada UV 366 nm terlihat jelas noda warna merah pada R_f 0,68 maka dipastikan jika sampel mengandung senyawa triterpenoid.

Hasil identifikasi daun mayana jantan terdeteksi mengandung golongan senyawa terpenoid, fenolik, flavonoid, dan triterpenoid (Tabel 4). Pada penelitian Fauzi *et al.*, (2017) uji KLT ekstrak etanol 96% daun mayana jantan dengan fase diam dan fase gerak yang sama diperoleh informasi adanya kandungan flavonoid, steroid dan triterpenoid, polifenolat, seskuiterpenoid dan monoterpenoid, dan kuinon, namun tidak mengandung alkaloid dan tanin.

Hasil uji bioautografi

Uji bioautografi merupakan pengujian untuk mengidentifikasi senyawa kimia apa yang bertanggung jawab dalam menghambat aktivitas antibakteri dari ekstrak mayana jantan (Paramita *et al.*, 2018). Konsentrasi ekstrak yang ditotolkan pada plat KLT adalah 80% sebanyak 1 totolan, dan menggunakan plat kontrol yang hanya dielusi oleh fase gerak tanpa menotolkan ekstrak.



Gambar 3. Hasil uji bioautografi: (a) Terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan nilai R_f 0; 0,24 dan 0,68, (b) Terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan nilai R_f 0

Uji bioautografi terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Gambar 3) terlihat zona bening tiga spot yaitu pada titik awal penotolan, pada Rf 0,24 dengan zona hambat 3 mm, dan pada nilai Rf 0,68 dengan zona hambat 4 mm, nilai Rf tersebut secara berturut-turut sesuai dengan nilai Rf pada senyawa fenolik dan triterpenoid. Pada penelitian Jakobina *et al.*, 2024 dan Kernou *et al.*, 2023 senyawa fenolik yang teridentifikasi pada daun *Coleus scutellarioides* adalah asam rosmarinat yang dapat berperan sebagai agen antibakteri. Peran fenolik sebagai antibakteri yaitu dengan merusak membran plasma, mendenaturasi protein, serta inaktivasi enzim pada bakteri (Kar, 2008). Senyawa triterpenoid yang terkandung dalam daun mayana jantan adalah α -amyrin dan β -amyrin (Suva *et al.*, 2015). Menurut Diaz-Ruiz *et al.* (2012) α -amyrin dan β -amyrin terbukti aktif mengurangi viabilitas bakteri hingga kurang dari 20%. Triterpenoid memiliki sifat antibakteri karena dapat memecah membran sel atau mengganggu pembentukan membran lipid, yang menyebabkan membran menjadi permeable sehingga terjadi kebocoran komponen sel (Cowan, 1999).

Pada hasil uji bioautografi bakteri *Klebsiella pneumoniae* (Gambar 3) memberikan hasil yang negatif, dikarenakan tidak terlihat adanya bercak KLT yang menghambat pertumbuhan bakteri, hanya ada zona hambat pada titik awal penotolan saja. Hal ini karena pemilihan fase gerak yang belum tepat, dimana fase gerak yang digunakan tidak dapat memisahkan senyawa yang bertanggung jawab sebagai antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun mayana jantan (*Coleus atropurpureus*) memiliki aktivitas antibakteri baik terhadap *Pseudomonas aeruginosa* maupun *Klebsiella pneumoniae* yang pada loading ekstrak 20 mg/sumuran memberikan aktivitas antibakteri terbesar masing-masing sebesar $12,2 \pm 0,3$ mm dan $11,3 \pm 0,3$ mm. Hasil uji KLT menunjukkan ekstrak daun mayana jantan positif mengandung terpenoid, fenolik, flavonoid, dan triterpenoid. Uji bioautografi terhadap *Pseudomonas aeruginosa* teridentifikasi bahwa fenolik dan triterpenoid bertanggung jawab memberikan aktivitas antibakteri sedangkan bioautografi pada *Klebsiella pneumoniae* tidak dapat menunjukkan senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media* (4th ed.). ASM Press.
- Badrunasar, A. & Santoso, H. B. (2016). *Tumbuhan Liar Berkhasiat Obat*. Forda Press.
- Boleng, D. T. (2015). *Bakteriologi: Konsep-Konsep Dasar*. Universitas Muhammadiyah Malang.
- Burd, E. M., & Hinrichs, B. H. (2016). Gastrointestinal Infections. in Leonard, D. G. B. (Ed), *Molecular Pathology in Clinical Practice*, 707–734. Springer Internationale Publishing Switzerland.
- CLSI, 2020, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 128–130. <https://doi.org/10.3390/currncol14040004>
- Dayanti, R., & Suyatno. (2012). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bagian Batang Tumbuhan Paku *Nephrolepis radicans* (Burm.) Kuhn. *Journal of Chemistry*, 1(1), 86–92.
- Diaz-Ruiz, G., Hernandez-Vazquez, L., Luna, H., Del Carmen Wachter-Rodarte, M., & Navarro-Ocana, A. (2012). Growth Inhibition of Streptococcus from the Oral Cavity by α -Amyrin Esters. *Molecules*,

- 17(11), 12603–12611. <https://doi.org/10.3390/molecules171112603>
- Fajriaty, I., Ih, H., & Setyaningrum, R. (2018). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis dari Ekstrak Etanol Daun Bintangur (*Calophyllum soulattri* Burm. F.). *Jurnal Pendidikan Informatika Dan Sains*, 7(1), 54–67.
- Fauzi, N. P., Sulistiyangsih, & Runadi, D. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Jawer Kotok (*Coleus atropurpureus* (L) Benth.) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* ATTC 1223 dan *Staphylococcus epidermidis* ATTC 12228. *Farmaka*, 15(3), 45–55.
- Harborne, J. . (1998). *Phytochemical Methods : A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* (3rd ed.). Chapman & Hall.
- Hayati, Z., Azwar, & Puspita, I. (2012). Pola dan Sensitivitas Antibiotik Bakteri Yang Berpotensi Sebagai Penyebab Infeksi Nosokomial di Ruang Rawat Bedah RSUDZA Banda Aceh. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 20(3), 158–166.
- Jakobina, M., Łyczko, J., Szumny, A., & Galek, R. (2024). The influence of Cultivation Conditions on The Formation of Psychoactive Salvinorin A, Salvinorin B, Rosmarinic Acid and Caffeic Acid in *Coleus scutellarioides*. *Scientific Reports*, 14(6693), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57399-y>
- Jawetz, E., Melnick, J. K., & Adelberg, E. A. (1995). *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kadir. (2015). *Statistika Terapan: Konsep, Contoh dan Analisis Data dengan Program SPSS/Lisrel dalam Penelitian*. PT Raja Grafindo Persada.
- Kar, A. (2008). *Pharmaceutical Microbiology*. New Age International Publishers.
- Kartikasari, D., Nurkhasanah, & Pramono, S. (2015). Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Bertonii (*Stevia rebaudiana*) Dari Tiga Tempat Tumbuh. *Prosiding Seminar Nasional "Perkembangan Terbaru Pemanfaatan Herbal Sebagai Agen Preventif Pada Terapi Kanker"*, 145–151. Universitas Wakhid Hasyim.
- Kautsar, A. P., Ayunovani F. S., M., & Surahman, E. (2016). The Influence of Demographic, Social System, Communication System, and Herbal Characteristics on Purchase Decisions of Herbal Medicine in Indonesia. *Journal of Economics, Business and Management*, 4(3), 235–238. <https://doi.org/10.7763/joebm.2016.v4.396>
- Kemenkes RI. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kernou, O. N., Azzouz, Z., Madani, K., & Rijo, P. (2023). Application of Rosmarinic Acid with Its Derivatives in the Treatment of Microbial Pathogens. *Molecules*, 28(4243), 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules28104243>
- Kronman, M. P., Zhou, C., & Mangione-Smith, R. (2014). Bacterial Prevalence and Antimicrobial Prescribing Trend for Acute Respiratory Tract Infections. *Pediatrics*, 134(4), e956-65.
- Lay, B. (1994). *Analisis Mikroba di Laboratorim*. Raja Grafindo Persada.
- Makatepuge, A. J., & Lebang, J. S. (2023). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana Jantan (*Coleus atropurpureus* Benth) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* Dan *Salmonella typhimurium*. *Pharmacon*, 12(1), 9–18.
- Malay, M. N. (2022). *Belajar Mudah & Praktis Analisis Data dengan SPSS dan JASP*. CV Madani Jaya.
- Markham, K.R. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerbit ITB.
- Mireles, A. L. F., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary Tract Infections: Epidemiology, Mechanism of Infection and Treatment Options. *Nat Rev Microbiol*, 13(5), 269–284.
- Muljono, P., Fatimawali, & Manampiring, A. E. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mayana Jantan (*Coleus atropurpureus* Benth) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus Sp.* dan *Pseudomonas Sp.* *Jurnal E-Biomedik (EBm)*, 4(1), 164–172.

- Nugraha, M. T. A., Arviani, & Hanifah, L. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Miana (*Coleus atropurpureus* L.) terhadap *Staphylococcus Epidermidis* FNCC 0048 dan *Escherichia Coli* FNCC 0091. *Jurnal Kesehatan*, 15(1), 22–28. <https://doi.org/10.24252/kesehatan.v15i1.27103>
- Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N., & Hidayatulloh, A. (2020). Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt dengan Metode Difusi Sumuran dan Metode Difusi Cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*, 1(2), 41-46. <https://doi.org/10.24198/jthp.v1i2.27537>
- Paputungan, W. A., Lolo, W. A., & Siampa, J. P. (2019). Aktivitas Antibakteri dan Analisis KLT-Bioautografi dari Fraksi Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). *Pharmakon*, 8(3), 516-524. <https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29325>
- Paramita, S., Yasir, Y., Yuniati, Y., Sina, I., (2018). Analisis Bioautografi Kromatografi Lapis Tipis dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bawang Tiwai (*Eleutherine bulgosa* (Mill.) Urb.) terhadap Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1(9), 470–478.
- Parija, S. C. (2012). *Textbook of Microbiology & Immunology* (2nd ed.). Elsevier.
- Qolbi, N., & Yuliani, R. (2018). Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Sepuluh Daun Tanaman terhadap *Klebsiella Pneumoniae*. *Pharmakon: Jurnal Farmasi Indonesia*, 15(1), 8–18. <https://doi.org/10.23917/pharmakon.v15i1.6169>
- Sangi, M., Runtuwene, M. R. J., Simbala, H. E. I., & Makang, V. M. A. (2008). Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat Di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry Progress*, 1(1), 47–53.
- Signore, A. (2013). About Inflammation and Infection. *EJNMMI Research*, 3(8), 1-2.
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). *Gram Stain Protocols*. American Society for Microbiology. <https://asm.org/>
- Soedarto. (2015). *Buku Mikrobiologi Kedokteran*. Sagung Seto.
- Suva, M. A., Patel, A. M., & Sharma, N. (2015). Coleus Species: *Solenostemon scutellarioides*. *Inventi Rapid: Planta Activa*, 2015(2), 1–5.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Vinh, D. C., & Embil, J. M. (2005). Rapidly Progressive Soft Tissue Infections. *Lancet Infect Dis.*, 5(8), 501-13.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1998). *Plant Drug Analysis : A Thin Layer Chromatography Atlas* (2nd ed.). Springer.
- Wakhidah, A. Z., & Silalahi, M. (2018). Etnofarmakologi Tumbuhan Miana (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth) pada Masyarakat Halmahera Barat, Maluku Utara. *Jurnal Pr*, 5(1), 567–578.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- Wang, Y., Rodríguez de Gil, P., Chen, Y. H., Kromrey, J. D., Kim, E. S., Pham, T., Nguyen, D., & Romano, J. L. (2017). Comparing the Performance of Approaches for Testing the Homogeneity of Variance Assumption in One-Factor ANOVA Models. *Educational and Psychological Measurement*, 77(2), 305–329. <https://doi.org/10.1177/0013164416645162>
- Wulandari, S., & Suryani, L. (2008). Deteksi Kuman Salmonella pada Ayam Goreng yang Dijual di Warung Makan dan Pola Kepekaan terhadap Berbagai Zat Antibiotika. *Mutiara Medika Edisi Khusus*, 8(2), 101–106.