

EFEKTIVITAS SENYAWA AKTIF KOMBINASI KENCUR *Kaempferia galanga* DAN ILALANG *Imperata cylindrica* SECARA *IN VITRO* TERHADAP BAKTERI GRAM POSITIF DAN BAKTERI GRAM NEGATIF

EFFECTIVITY OF KENCUR COMBINATION ACTIVE COMPOUNDS *Kaempferia galanga* DAN AND ILALANG *Imperata cylindrica* *IN VITRO* AGAINST POSITIVE GRAM BACTERIA AND NEGATIVE GRAM BACTERIA

Melia Soniman*, Denny Syaputra, Andri Kurniawan

Jurusan Akuakultur, Fakultas Pertanian Perikanan dan Biologi, Universitas
Bangka Belitung, Jl. Balun ijuk Sungailiat, Kabupaten Bangka.

*E-mail: meliasoniman98@gmail.com

ABSTRAK

Peran tanaman obat atau herbal pada sistem pencegahan dan pengobatan semakin penting di masa mendatang, dan penggunaannya secara kombinasi dipandang lebih efektif dan memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan secara tunggal. Salah satu produk jamu dari kombinasi tanaman obat kencur (*Kaempferia galanga*) dan ilalang (*Imperata cylindrica*) dengan nama dagang Meddia Meddwa telah dikaji aktifitas antibakterinya. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efektivitas, aktivitas antibakteri secara *in vitro*, dan konsentrasi terbaik dari kombinasi kedua tanaman dalam Jamu Meddia Meddwa terhadap bakteri Gram positif *S. aureus* dan Gram negatif *A. hydrophila*. Dalam penelitian ini dianalisis senyawa aktif fitokimia yang terkandung dari kombinasi kedua senyawa tersebut. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental laboratorium menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa memiliki aktivitas antibakteri. Diameter zona hambat untuk semua konsentrasi ekstrak yang diujikan pada *A. hydrophila* dan *S. aureus* berbeda nyata ($P < 0,05$). Efektif menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif *A. hydrophila* dibandingkan terhadap bakteri Gram negatif *S. aureus*. Senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa adalah alkaloid, flavonoid, steroid dan fenol hidrokuinon. Konsentrasi terbaik simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* adalah 6 ppt.

Kata kunci: Antibakteri, Meddia Meddwa, uji *in vitro*, *A. hydrophila*, *S. aureus*.

ABSTRACT

The role of medicinal plants or herbs in prevention and treatment systems is increasingly important in the future, and their use in combination is seen as more effective and has higher antibacterial activity than singly. One of the herbal products from a combination of the medicinal plants kencur (*Kaempferia galanga*) and thatch (*Imperata cylindrica*) with the name Meddia Meddwa has been studied for its antibacterial activity. This study aims to analyze the effectiveness antibacterial activity *in vitro*, and the best concentration of the combination of both in Meddia Meddwa Jamu against Gram positive *S. aureus* and Gram negative *A. hydrophila* bacteria. In this study, the phytochemical active compounds contained in the combination of both compounds were analyzed. The research method used was a laboratory experimental using a completely randomized design (CRD). The results showed that the combination of kencur and thatch in the medicinal herbs Meddia Meddwa has antibacterial activity. Inhibition zone diameter for all extract concentrations tested on *A. hydrophila* and *S. aureus* were significantly different ($P < 0.05$), effectively inhibits the growth of Gram positive bacteria *A. hydrophila* compared to Gram negative bacteria *S. aureus*. The active compounds contained in the simplicia of the combination of kencur and thatch in Meddia Meddwa are alkaloids, flavonoids, steroids and phenol hydroquinone. The best concentration of kencur and thatch combination simplicia in the medicinal herbs Meddia Meddwa in inhibiting the growth of *A. hydrophila* and *S. aureus* bacteria was 6 ppt.

Keywords: Antibacterial, Meddia Meddwa, *in vitro*, *A. hydrophila*, *S. aureus*.

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki beranekaragam tanaman obat sehingga dijuluki sebagai *live laboratory* dengan total sekitar 9.600 spesies dari 30.000 spesies tumbuhan yang diketahui berkhasiat obat (Hapsah dan Hasanah, 2011). Pengobatan tradisional menjadi salah satu sistem pengobatan primer di beberapa negara berkembang seperti Indonesia (Bhalodia dan Shukla, 2011). Pengobatan tradisional yang banyak dikembangkan memiliki beberapa alasan, yaitu harganya murah, mudah diperoleh, aman digunakan, dan kecilnya efek samping (dampak negatif) dari obat tradisional tersebut (Sartinah, 2011). Rasionalitas untuk menggunakan tanaman obat atau herbal menjadikan pemanfaatannya dipandang memegang peranan penting pada sistem pencegahan dan pengobatan pada masa sekarang.

Ekstrak tanaman dapat menjadi alternatif dalam pengendalian yang lebih aman, efektif, dan efisien (Utomo dan Supriyatna, 2014). Salah satu tanaman obat telah dikaji aktifitas antibakterinya, salah satunya adalah kencur (*Kaempferia galanga*) dan ilalang (*Imperata cylindrica*). Hasil skrining fitokimia terhadap rimpang kencur menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid, polifenol, tannin, steroid, monoterpen, dan seskuiterpen (Hasanah *et al.*, 2009). Ilalang juga terdeteksi memiliki kandungan senyawa aktif alkaloid, flavanoid, steroid, terpenoid, dan tannin (Seniwaty *et al.*, 2009). Komponen-komponen fitokimia tersebut merupakan senyawa bioaktif yang berperan sebagai antibakteri (Poeloengan *et al.*, 2010).

Pemanfaatan tanaman obat secara kombinasi dipandang lebih efektif dan memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak tunggal. Hal ini dikarenakan beberapa komponen dari ekstrak tersebut dapat bekerja sinergis untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Hasan *et al.*, 2022).

Ekstrak rimpang kencur memiliki aktivitas antifungi terhadap *Saprolegnia* sp. secara *in vitro* yaitu aktivitas menghambat pertumbuhan dan membunuh (Kusdarwati *et al.*, 2017). Penelitian tersebut menunjukkan efektivitas kombinasi tanaman obat terhadap bakteri dan penyebab infeksi lainnya seperti virus yang lebih baik dibandingkan ekstrak tunggal dari setiap tanaman tersebut.

Uraian diatas menunjukkan bahwa tanaman obat dan pemanfaatan kombinasi tanaman obat tersebut perlu mendapat perhatian lebih didalam implementasinya untuk kesehatan. Pemanfaatan khasiat tanaman obat tersebut dapat pula

diaplikasikan kepada komoditas budidaya ikan sehingga diharapkan dapat berkontribusi dalam peningkatan kesehatan ikan dan keamanan produk yang dihasilkan.

Salah satu produk jamu dari kombinasi tanaman obat dihasilkan dalam skala industri oleh PT. Meddia Herbal, Pekalongan dengan nama Meddia Meddwa. Produk ini terdiri atas kombinasi tanaman obat kencur (*K. galanga*) dan ilalang (*I. cylindrica*) yang selama ini digunakan dalam penanganan penyakit pada manusia. Keberadaan jamu ini perlu juga dikaji efektivitasnya dalam mengendalikan penyakit pada organisme budidaya dalam rangka memperluas spektrum pemanfaatan jamu sebagai tanaman obat asli Indonesia pada berbagai organisme. Upaya pemanfaatan jamu tersebut dapat dilakukan dengan metode laboratoris secara *in vitro* dengan mengetahui kandungan senyawa aktif jamu dan kemampuan senyawa aktif tersebut untuk menghambat aktivitas mikroorganisme infeksius.

Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi adalah bakteri *A. hydrophila* (Gram negatif) dan *S. aureus* (Gram positif). Merupakan bakteri patogen, baik pada manusia atau hewan khususnya ikan. *A. hydrophila* adalah bakteri oportunistik, Gram negatif, dapat menyebabkan kematian ikan dalam waktu yang sangat singkat hingga mencapai 80-100 % (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012). Bakteri ini umumnya menyerang ikan air tawar seperti ikan gurami, mas, lele, dan nila (Tantu *et al.*, 2013; Firnanda *et al.*, 2013). Bakteri menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat menyerang ikan sehat (Afrianto *et al.*, 2015). Bakteri *A. hydrophila* juga dapat menyebabkan diare pada manusia (Mulia *et al.*, 2009).

Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif berbentuk bulat tersusun seperti buah anggur. *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit pada ikan dengan merusak organ ginjal, limpa, dan berperan sebagai bakteri penyebab infeksi sekunder pada ikan (Atyah *et al.*, 2010). Infeksi *S. aureus* pada ikan mengindikasikan adanya kontaminasi kebersihan air atau infeksi sekunder pada ikan (Hammad *et al.*, 2012). Pada manusia *S. aureus* ditemukan pada saluran pernapasan atas, muka, tangan, dan rambut. Diantara organ yang sering diserang oleh *S. aureus* adalah kulit yang mengalami luka (Amalia, 2016). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis efektivitas, aktivitas antibakteri secara *in vitro*, dan konsentrasi terbaik dari kombinasi kencur dan ilalang dalam Jamu Meddia Meddwa terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus*) dan Gram negatif

(*A. hydrophila*). Penelitian ini juga menganalisis kandungan senyawa aktif atau fitokimia yang terkandung dari kombinasi kencur dan ilalang pada Jamu Meddia Meddwa.

METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Biologi Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi Universitas Bangka Belitung. Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan yaitu pada bulan Januari hingga Maret 2020 menggunakan metode eksperimental laboratorium dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Tunggal. Data yang diolah adalah diameter zona hambat sebagai pengaruh perlakuan yang dianalisis dengan sidik ragam (anova) pada taraf nyata 0,05 untuk mengetahui perbedaan antar perlakuannya. Analisis data dilanjutkan dengan uji Duncan.

Perlakuan

1. Perlakuan P1 : Kontrol positif (Penisilin)
2. Perlakuan P2 : Kontrol negatif (Aquadess)
3. Perlakuan P3 : Konsentrasi 6 ppt (0,03 gram Meddia Meddwa dalam 5 mL larutannya)
4. Perlakuan P4 : Konsentrasi 8 ppt (0,04 gram Meddia Meddwa dalam 5 mL larutannya)
5. Perlakuan P5 : Konsentrasi 14 ppt (0,07 gram Meddia Meddwa dalam 5 mL larutannya)
6. Perlakuan P6 : Konsentrasi 28 ppt (0,14 gram Meddia Meddwa dalam 5 mL larutannya)

Model Penelitian

Model rancangan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

- Y_{ij} : Pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
 μ : Rataan umum
 α_i : Pengaruh perbedaan dosis taraf ke-i
 ε_{ij} : Galat percobaan pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

Hipotesis

Hipotesis penelitian adalah sebagai berikut:

- $H_0: \alpha_i = 0$, konsentrasi simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa tidak berpengaruh terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

- $H_1: \alpha_i \neq 0$, konsentrasi simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa berpengaruh terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

- $H_0: \alpha_i = 0$, konsentrasi simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa tidak berpengaruh terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

- $H_1: \alpha_i \neq 0$, konsentrasi simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa berpengaruh terhadap diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Prosedur Kerja Utama Penelitian

1. Preparasi sampel

Sampel simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa yang telah tersedia dalam bentuk produk simplisia dengan komposisi campuran kencur dan ilalang dengan perbandingan 1:1.

2. Ekstraksi

Bahan yang telah halus menjadi bubuk kemudian ditimbang sebanyak 30 gram, dimasukkan kedalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 300 mL. Bahan yang telah tercampur dihomogenkan dengan menggunakan *orbital shaker* kecepatan 150 rpm selama 6 jam. Selanjutnya dimaserasi selama 72 jam (Sudarmi, 2015), lalu bahan disaring dengan kertas saring dan dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C selama ± 2 jam, diperoleh hasil ekstrak.

Bahan yang telah menjadi bubuk halus (simplisia) kemudian dilakukan proses ekstraksi. Proses ekstraksi kencur dan ilalang terdiri dari 2 tahapan yaitu maserasi dan evaporasi. Hasil rendemen diperoleh sebanyak 6.66 % atau sama dengan 2 gram ekstrak berwarna coklat pekat. Kemudian ekstrak diencerkan dengan aquades sebanyak 20 mL.

3. Analisis fitokimia

Analisis fitokimia dilakukan dengan tujuan mengidentifikasi adanya senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri pada ekstrak kombinasi kencur dan ilalang. Pengujian ini terdiri dari beberapa uji, yaitu uji alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan fenol hidrokuinon.

a) Analisis senyawa alkaloid

Analisis senyawa alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak kedalam 10 mL kloroform dan amoniak, ditambah 0.5 mL H_2SO_4 kemudian dihomogenkan dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan, diambil bagian lapisan atas kemudian

ditetsi pereaksi Meyer, Dragendorf, dan Wagner masing-masing sebanyak 1 tetes. Apabila terbentuk endapan putih dengan pereaksi Mayer, endapan merah jingga dengan pereaksi Dragendorf, dan endapan coklat dengan pereaksi Wagner maka ekstrak tersebut dinyatakan positif mengandung alkaloid (Seniwaty *et al.*, 2009).

b) Analisis senyawa flavonoid

Sebanyak 1 mL ekstrak sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan serbuk Magnesium 0.1 mg, 0.4 mL amil alkohol (campuran asam klorida 37% dan etanol 95% dengan volume yang sama) dan 4 mL alkohol. Dihomogenkan lalu diamati perubahan yang terjadi; terbentuknya warna kuning, merah, atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Santoso *et al.*, 2012).

c) Analisis senyawa saponin

Uji identifikasi senyawa golongan saponin pada ekstrak etanol menggunakan uji Forth. Uji ini bertujuan untuk mengidentifikasi ada tidaknya senyawa saponin pada ekstrak kental. Uji senyawa saponin dilakukan dengan diambil ekstrak sebanyak 1 mL kemudian dilarutkan dalam 5 mL aquades panas, selanjutnya dihomogenkan kurang lebih 10 detik. Buih atau busa yang terjadi dan stabil kurang lebih 10 menit menandakan bahwa ekstrak tersebut positif mengandung senyawa saponin (Depkes RI, 2009).

d) Analisis senyawa steroid

Dilarutkan 1 mL ekstrak kedalam 2 mL kloroform dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 tetes asam asetat glacial dan 3 tetes asam sulfat pekat. Setelah itu larutan dihomogenkan. Selanjutnya diamati sampel tersebut; terbentuknya warna awal merah pada larutan kemudian berubah menjadi warna biru, hijau, atau ungu menunjukkan adanya senyawa steroid (Santoso *et al.*, 2012).

e) Analisis senyawa fenol hidrokuinon

Dilarutkan 1 mL ekstrak kedalam 2 tetes FeCl_3 5% didalam tabung reaksi. Kemudian larutan dihomogenkan. Selanjutnya diamati perubahan warna pada sampel, hasil positif fenolik ditandai dengan terbentuknya cincin hijau sampai keunguan (Santoso *et al.*, 2012).

4. Uji *in vitro*

Metode yang digunakan pada pengujian *in vitro* adalah metode difusi atau metode cakram kertas antibiogram *Kirby-Bauer* (Ikrom, 2014). Uji *in vitro* terdiri dari beberapa tahapan, yaitu sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media, pembuatan suspensi bakteri uji, pembuatan media pengujian, dan penentuan aktivitas antibakteri.

Sterilisasi alat dan bahan

Seluruh alat dan disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan Bahan-bahan seperti Antibiogram *Kirby-Bauer*, dan media tekanan 1 atm selama 20 menit.

Pembuatan media

a) Media NA (*nutrient agar*)

Nutrient Broth (NB) sebanyak 1.5 gram dan agar sebanyak 2 gram dilarutkan ke dalam 100 mL akuades Lalu komposisi tersebut disatukan dalam labu erlenmeyer dan dipanaskan menggunakan *microwave* hingga semua komposisi menjadi homogen.

b) Media NB (*Nutrient Broth*)

Nutrient Broth (NB) sebanyak 1.5 gram dilarutkan ke dalam 100 mL akuades Media tersebut dimasukkan kedalam erlenmeyer diaduk hingga menjadi homogen.

c) Media agar miring

Pembuatan media agar miring sama seperti pembuatan media NA. Media yang sudah homogen dituangkan kedalam tabung reaksi sebanyak 5 mL lalu ditutup dengan sumbat disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang sudah steril dimiringkan dengan cara diletakkan di balok kayu dengan kemiringan 30°C dan didiamkan selama 1 hari.

Pembuatan suspensi bakteri uji

a) Pengambilan sampel isolat bakteri

Sampel isolat bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Program Studi Biologi Universitas Bangka Belitung. Isolat tersebut diremajakan kedalam agar miring untuk dilakukan pembiakan lanjutan dengan menggunakan *petri disk*. Sampel yang didapat diberi label, dan disimpan didalam lemari pendingin pada suhu -18°C untuk menjaga agar isolat tersebut tidak mati.

b) Isolasi bakteri

Isolat bakteri yang berada didalam tabung reaksi diisolasi kedalam media NA, menggunakan metode cawan tuang (*Pour plate*). Isolat diinkubasikan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

c) Seleksi dan Pemurnian Isolat

Isolat bakteri yang tumbuh diseleksi menurut perbedaan morfologi (bentuk, permukaan dan warna) lalu diisolasi dan dimurnikan. Pemurnian isolat dilakukan sebanyak 2 kali. Pemurnian pertama dilakukan dengan metode *Quadrant Streak* (Cappucino dan Sherman, 2001) pada media yang sama, sedangkan pemurnian kedua dilakukan dengan metode *Continuous Streak Plate* pada media

yang sama. Kemudian isolat ditumbuhkan pada media (NA) *petri disk* dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C. Setelah isolat tumbuh, isolat dipindahkan kedalam lemari pendingin dengan suhu -18°C untuk menjaga agar isolat tersebut tidak mati.

Pembuatan media pengujian

Media (NA) dipanaskan menggunakan *microwave* hingga mencair. Kemudian didinginkan hingga suhu media 40-50°C, kemudian media dituang kedalam *petri disk*. 10 mL NA dituangkan kedalam 8 *petri disk* hingga rata. Sebelum media dituang, *petri disk* dibuat garis menjadi 6 bagian, yaitu K+, K-, 6 ppt, 8 ppt, 14 ppt, dan 28 ppt. Pada kontrol positif menggunakan penisilin dan kontrol negatif menggunakan aquades. *Petri disk* dibiarkan agak terbuka didalam *laminar air flow* selama 10-15 menit, kemudian *petri disk* ditutup dan dibalikkan posisi letaknya agar tidak ada uap pada media. Media ditunggu 2-3 jam hingga media benar-benar mengeras dan memadai sempurna.

Penentuan aktivitas antibakteri

Kegiatan ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri simplisia kombinasi kencur dan ilalang yang dilakukan dengan metode difusi agar, dengan cara mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* yang terdapat disekitar kertas cakram.

Langkah-langkah uji aktivitas antibakteri adalah sebagai berikut:

1. Pembuatan konsentrasi kombinasi kencur dan ilalang. Simplisia direbus dengan air mendidih pada suhu 95-100°C selama 10-20 menit pada suhu 95-100°C setelah itu bahan didinginkan. Bahan direbus sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan.
2. Perendaman kertas cakram steril dengan simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam bentuk jamu Meddia Meddwa konsentrasi 6 ppt, 8 ppt, 14 ppt, dan 28 ppt selama 15 menit.
3. Sebanyak 1 olesan cottonbud steril isolat bakteri dimasukkan kedalam *petri disk* yang telah berisi media NA, kemudian digores zig zag hingga permukaan media rata. *Petri disk* sebelumnya digaris menjadi 6 bagian agar bertumpu.
4. Kertas cakram steril yang telah direndam dengan simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam bentuk jamu Meddia Meddwa dengan berbagai konsentrasi ditempelkan kedalam *petri disk* sesuai dengan pembagian garis. Begitu pula dengan K+ maupun K- tetap diberi kertas cakram.
5. *Petri disk* dibungkus menggunakan *plastic wrap*, dan diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam

pada suhu 37°C. Semua pekerjaan ini dilakukan di *laminar air flow* dan api bunsen untuk menjaga agar media tetap steril dan menghindari kontaminasi.

6. Dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat dengan melihat zona bening dari setiap kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong dengan cara mengukur secara horizontal dan vertikal kemudian hasil yang didapat dikurangi diameter kertas cakram 6 mm.

Prosedur Kerja Penunjang Penelitian

1. Uji pewarnaan gram

Bertujuan untuk mengetahui sifat dari bakteri yang diujikan. Pewarnaan gram dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 100X. Adapun bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophila*

Cara kerja dari pewarnaan gram yaitu, disiapkan *object glass* yang telah dibersihkan dengan alkohol 70% dan diberi label, lalu ditetaskan 1 tetes aquades steril pada permukaan *object glass*. Kemudian diambil isolat sebanyak 1 ose dengan menggunakan jarum ose steril, lalu dicampur dengan aquades dan diaduk merata pada permukaan *object glass*. Campuran isolat dan aquades kemudian difiksasi dengan melewati preparat diatas api bunsen (jarak 15 cm) beberapa kali sampai terlihat kering, kemudian ditetaskan larutan kristal violet pada preparat dan didiamkan selama 1 menit, kemudian preparat dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya ditetaskan larutan iodin lugol dan didiamkan selama 1 menit lalu preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Selanjutnya ditetaskan larutan alkohol aseton sampai merata dan didiamkan maksimal 30 detik, lalu preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Kemudian ditetaskan larutan safranin sampai merata dan didiamkan selama 2 menit, lalu preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Sifat bakteri selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskop mikroskop (SNI 7303, 2009).

Bakteri *A. hydrophila* ditandai dengan sel bakteri bewarna merah atau pink, berbentuk batang pendek. Sedangkan bakteri *S. aureus* ditandai dengan bakteri bewarna ungu, berbentuk bulat (Coccus), tersusun secara berkelompok yang tidak teratur seperti buah anggur (Jawetz *et al.*, 2005).

2. Kurva pertumbuhan bakteri

Media yang digunakan pada pengukuran kurva bakteri adalah media NB (*Nutrient Broth*). Fase pertumbuhan bakteri yang digunakan pada uji daya hambat adalah bakteri pada fase

pertumbuhan eksponensial (*log phase*). Hal ini karena pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang optimum. Metode yang digunakan dalam penentuan kurva pertumbuhan bakteri adalah metode turbidimetri yang didasarkan pada pengukuran kekeruhan atau turbidity (kuantitatif). Pengukuran turbidimetri digunakan untuk mengetahui jumlah biomassa sel total dalam suspensi dengan mengukur kerapatan cahaya atau densitas optik kultur kaldu dengan spektrofotometer UV-Vis, yang dinyatakan dalam unit absorbance atau daya serap.

Penumbuhan bakteri merujuk pada metode yang dikemukakan oleh Cappuccino dan Sherman (2001). Sampel bakteri diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600 nm. Penentuan panjang gelombang tersebut dilakukan dengan melihat absorbansi paling tinggi dari rentang panjang gelombang 580-630 nm (Khurdy, 2014). Pembacaan nilai absorbansi dilakukan setiap 2 jam sekali mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-24. Nilai absorbansi 0.6-0.8 (setara dengan konsentrasi 10^6 - 10^8 sel/mL) ditentukan sebagai waktu pertumbuhan optimum bakteri, sehingga untuk pengujian aktivitas antibakteri digunakan bakteri yang berada pada nilai absorbansi 10^6 - 10^8 (Hermawan, 2017). Setelah dilakukan uji maka diperoleh data dalam bentuk grafik sigmoid dengan mengabungkan nilai absorbansi dan waktu pengukuran sampel bakteri. Uji ini menggunakan alat dan bahan yang telah steril dan dilakukan di *laminar air flow* dan api bunsen untuk menjaga agar media tetap steril dan menghindari kontaminasi.

HASIL

1. Analisis fitokimia

Hasil skrining fitokimia simplisia kombinasi kencur dan ilalang menunjukkan bahwa simplisia positif mengandung senyawa metabolit sekunder antara lain flavonoid, alkaloid, steroid, dan fenol hidrokuinon. Namun, untuk hasil pengujian untuk golongan senyawa saponin menunjukkan hasil negatif, (Tabel 1 dan Gambar 1).

2. Uji *in vitro*

Berdasarkan hasil uji *in vitro*, terlihat bahwa ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam bentuk jamu Meddia Meddwa memiliki kemampuan menghambat bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus*. Hal ini dibuktikan dengan adanya zona hambat

yang terbentuk disekitar kertas cakram (Gambar 2). Berdasarkan hasil analisis, rata-rata diameter zona hambat dari semua konsentrasi simplisia yang diujikan pada bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* diperoleh hasil yang berbeda nyata. Rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa berbeda nyata ($P < 0,05$) diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan *S. aureus*. Bakteri *A. hydrophila* pada perlakuan kontrol positif berbeda nyata dengan perlakuan dosis 6 ppt, 24 ppt 8 ppt, 14 ppt, dan kontrol negatif. Perlakuan dosis 6 ppt tidak berbeda nyata dengan perlakuan dosis 24 ppt, 8 ppt, 14 ppt, dan kontrol negatif. Bakteri *S. aureus* pada perlakuan 6 ppt berbeda nyata dengan perlakuan kontrol positif, perlakuan 8 ppt, 24 ppt, 14 ppt, dan kontrol negatif. Perlakuan 1 tidak berbeda nyata dengan perlakuan dosis 8 ppt dan 24 ppt, tetapi berbeda nyata dengan perlakuan 6 ppt, 14 ppt, dan kontrol negatif. Perlakuan 14 ppt berbeda nyata dengan perlakuan 6 ppt, kontrol positif, perlakuan dosis 8 ppt, dan kontrol negatif. Perlakuan kontrol negatif berbeda nyata dengan perlakuan 6 ppt, kontrol positif, perlakuan dosis 8 ppt, 24 ppt, dan 14 ppt.

5. Uji pewarnaan gram

Hasil uji pewarnaan gram bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* didapatkan hasil, bahwa *A. hydrophila* merupakan bakteri Gram negatif dan *S. aureus* adalah bakteri Gram positif. Bakteri *A. hydrophila* bewarna merah atau pink dan bakteri *S. aureus* bewarna ungu (Gambar 3).

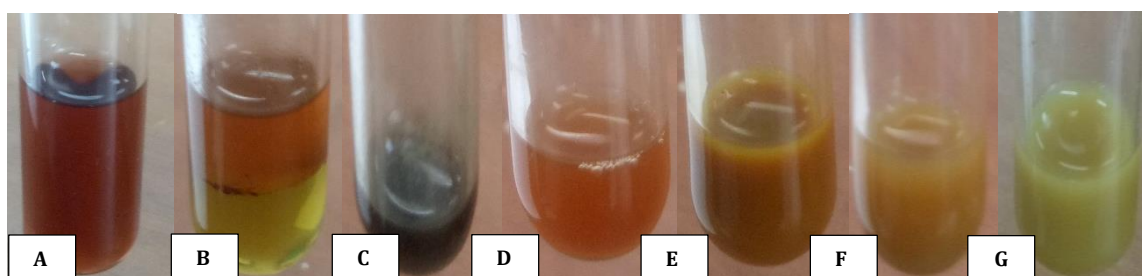
6. Kurva pertumbuhan bakteri

Pada hasil pengamatan diperoleh fase pertumbuhan yang berbeda terhadap jenis bakteri yang diamati. Kurva pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* (Gambar 4 dan Gambar 5). Kurva pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa fase adaptasi pada bakteri *A. hydrophila* terjadi dari jam ke-0 hingga jam ke-8, sedangkan pada bakteri *S. aureus* terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-4, fase eksponensial jam ke-10 sampai jam ke-18 pada *A. hydrophila* jam ke-6 sampai jam ke-18 pada *S. aureus*, fase stasioner jam ke-20 pada *A. hydrophila* jam ke-20 sampai jam ke-22 pada *S. aureus*, dan fase kematian jam ke-24 pada *S. aureus*. ke-22 sampai jam ke-24 pada *A. hydrophila*.

Tabel 1. Hasil analisis fitokimia ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa.

Senyawa Metabolit Sekunder	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Mayer	(-)	Tidak terbentuk endapan
	Dragendorf	(+)	Endapan merah jingga
	Wagner	(+)	Endapan coklat
Flavonoid	Mg + amil alkohol + alkohol	(+)	Terbentuk warna jingga
Steroid	Kloroform + asam asetat glacial + H ₂ SO ₄ pekat	(+)	Terbentuk warna hijau
Saponin	Aquades	(-)	Tidak terdapat busa atau buih
Fenol hidrokuinon	FeCl ₃	(+)	Berubah menjadi hijau

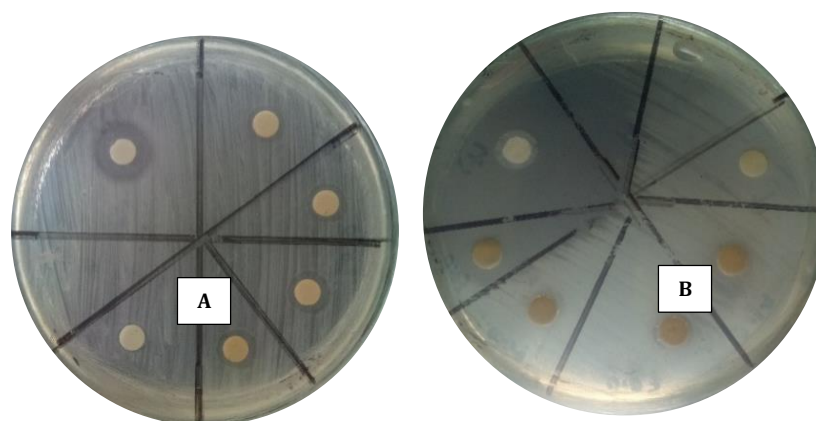
Keterangan: (+): Positif, (-): Negatif



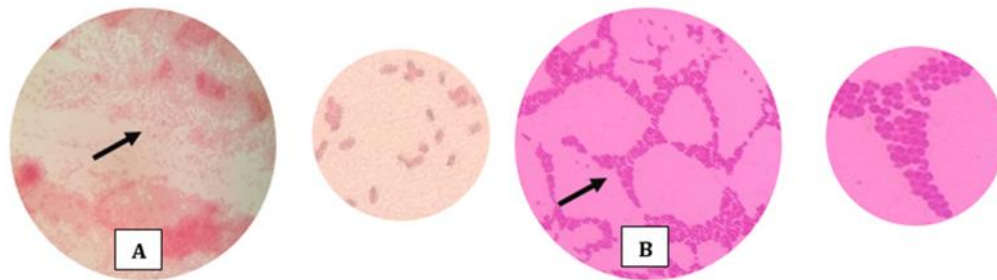
Gambar 1. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa (A) Flavonoid, (B) Steroid, (C) Fenol hidrokuinon, (D) Dragendorf, (E) Wagner, (F) Mayer, (G) Saponin.

Tabel 2. Rata-rata diameter zona hambat simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus*.

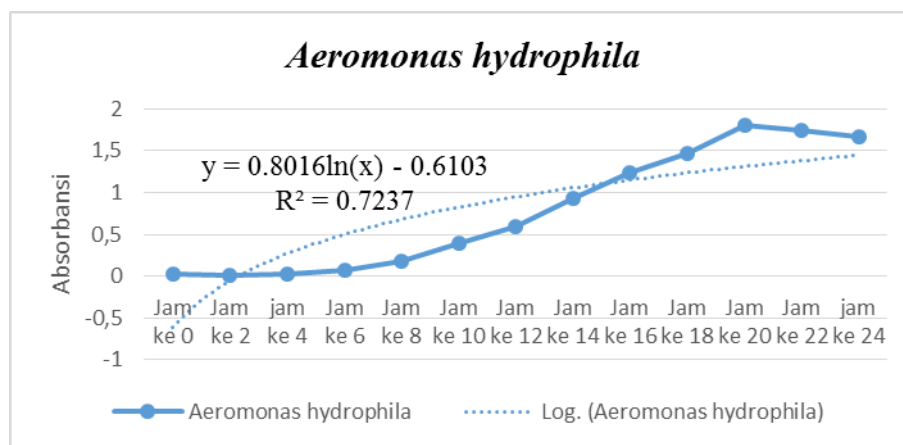
Konsentrasi (ppt)	Ulangan	<i>A. hydrophila</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)
Negatif	4	0.00 ± 0.000000	0.00 ± 0.000000
Positif	4	13.03 ± 5.4859997	5.06 ± 2.700424
6	4	2.8 ± 0.127932	5.96 ± 1.934138
8	4	1.96 ± 0.915801	4.61 ± 3.056222
14	4	1.75 ± 1.282637	2.11 ± 1.659217
28	4	2 ± 1.167772	4.61 ± 1.168657



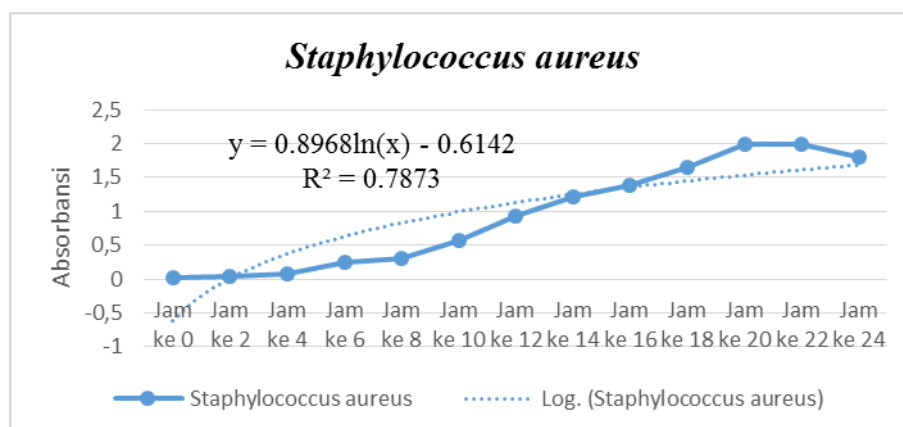
Gambar 2. Hasil uji antibakteri ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa terhadap bakteri A) *A. hydrophila* dan B) *S. aureus*.



Gambar 3. Hasil uji pewarnaan gram A) *A. hydrophila* B) *S. aureus*.



Gambar 4. Kurva pertumbuhan *A. hydrophila*: lag phase = jam ke 0-8, log phase = jam 10-18, stasioner phase = jam ke 20, death phase = jam ke 22-24.



Gambar 5. Kurva pertumbuhan *S. aureus*: lag phase = jam ke 0-4, log phase = jam 6-18, stasioner phase = jam ke 20-22, death phase = jam ke 24.

PEMBAHASAN

1. Estraksi

Dalam penelitian ini ekstrak yang dihasilkan termasuk dalam kategori yang baik karena proses ekstraksi dilakukan dengan teknik yang benar mulai dari metode maserasi sampai proses evaporasi sehingga diperoleh ekstrak yang baik dengan ciri –ciri bewarna coklat pekat, tekstur kental, bersih, dan tidak berbau. Rendemen yang diperoleh sebanyak 6.66 % atau sama dengan 2 gram ekstrak. Proses ekstraksi digunakan untuk memperoleh bahan aktif seperti fenolik, flavonoid, tanin dan aktivitas antioksidasi dari tumbuhan (Kurniawan *et al.*, 2022).

2. Analisis fitokimia

Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak kombinasi kencur dan ilalang positif mengandung senyawa aktif antara lain alkaloid, flavonoid, steroid, dan fenol hidrokuinon (Tabel 6). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Gholib, 2011), juga menyebutkan bahwa kencur mengandung senyawa alkaloid, minyak atsiri, saponin, tannin, flavonoid, fenolik dan glikosida. Namun dalam penelitian ini, untuk senyawa saponin belum teridentifikasi, hal ini kemungkinan dikarenakan bahan uji yaitu ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa yang digunakan pada penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya. Komposisi senyawa yang terkandung dalam tanaman dipengaruhi oleh berbagai faktor. Baik faktor internal maupun eksternal. Faktor internal seperti adanya pengaruh pada varietas/gen dan yang termasuk faktor eksternal yaitu, adanya pengaruh cahaya matahari, curah hujan, struktur tanah, maupun iklim di daerah tersebut sehingga terdapat perbedaan terhadap kandungan ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa. Hal ini didukung oleh pendapat Creswel *et al.*, (2005) bahwa adanya faktor lingkungan yang mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder pada tumbuhan yaitu ketinggian tempat tumbuh, pH tanah, kelembaban udara dan intensitas cahaya matahari. Perbedaan senyawa aktif terhadap lokasi yang berbeda dilakukan oleh penelitian Salim *et al.*, (2016) bahwa perbedaan senyawa yang terdeteksi pada tanaman duku pada lokasi yang berbeda dipengaruhi oleh prekursor biosintesis metabolit sekundernya dan tekstur tanah pada tempat tumbuh tanaman. Perawatan pada lahan tanaman sangat diperlukan, kandungan hara C-organik yang tinggi pada daerah tumbuhnya tanaman ini kemungkinan besar didapatkan dari hasil

pemupukan yang rutin dilakukan setahun sekali oleh petani. Jadi walaupun tekstur tanah tidak terlalu ideal untuk media tanah, yaitu lempung berpasir, liat dan berdebu tetapi dengan perawatan yang baik dapat menghasilkan kandungan senyawa lebih banyak.

Selain itu penyebab tidak teridentifikasinya senyawa saponin kemungkinan juga dikarenakan pemilihan metode yang kurang tepat, metode yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa saponin dalam penelitian ini yaitu dengan uji Forth. Sebenarnya selain uji Forth senyawa flavonoid juga dapat diidentifikasi dengan metode lain yaitu Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Kromatografi Lapis Tipis adalah pemisahan komponen fitokimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisipasi yang ditentukan oleh fase diam. Fase diam berupa serbuk halus, KLT menggunakan bahan penjerap yang umum adalah silika gel, aluminium oksida, kieselgur, selulosa dan turunannya, serta poliamida (Dew *et al.*, 2021).

Terdapat senyawa alkaloid dengan adanya pereaksi yang digunakan. Terbentuknya endapan merah jingga pada pereaksi Dragendorff, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner. Sedangkan pada pereaksi Mayer jika hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Hal ini sesuai dengan pendapat Seniwaty *et al.* (2009) bahwa jika terdapat endapan putih pada pereaksi Mayer, endapan merah jingga pada pereaksi Dragendorff, dan endapan coklat pada pereaksi Wagner maka positif mengandung alkaloid. Pereaksi Meyer mengandung kalium iodida dan merkuri klorida. Terbentuknya hasil negatif pereaksi Mayer diperkirakan karena endapan tersebut tidak kompleks kalium-alkaloid, nitrogen tidak bereaksi dengan ion logam K^+ . Hal ini didukung oleh pendapat Marlina *et al.*, (2005) bahwa Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Sementara pereaksi Wagner mengandung kalium iodida dan iod. Pereaksi Wagner didapatkan hasil positif dengan terdapatnya endapan coklat. Hal ini Diperkirakan karena endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion I^- dari kalium iodida menghasilkan ion I_3^- yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marlina *et al.*, 2005). Sedangkan pereaksi Dragendorff didapatkan hasil positif

dengan endapan berwarna merah jingga. Endapan tersebut adalah kalium alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis membentuk ion bismut (BiO^+). Pereaksi Dragendorff mengandung bismut nitrat dan merkuri klorida dalam asam nitrit berair. Pereaksi-pereaksi ini digunakan berdasarkan kesanggupan alkaloid untuk bergabung dengan logam yang memiliki berat atom tinggi seperti merkuri, bismut, tungsten, atau iod (Seniwaty *et al.*, 2009). Mekanisme kerja alkaloid yang terkandung pada ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam bentuk jamu Meddia Meddwa sebagai antibakteri yaitu dengan lisisnya komponen peptidoglikan penyusun lapisan membran sel bakteri (Septiana, 2011).

Flavonoid merupakan golongan metabolit sekunder yang disintesis dari asam piruvat melalui metabolisme asam amino. Flavonoid merupakan golongan fenol terbesar senyawa yang terdiri dari C6-C3-C6 dan sering ditemukan diberbagai macam tumbuhan dalam bentuk glikosida atau gugusan gula bersenyawa pada satu atau atau lebih grup hidroksil fenolik (Bhat *et al.*, 2009). Terdapat senyawa flavonoid pada ekstrak. Hal ini disebabkan karena Magnesium sebagai pereduksi dimana reduksi tersebut dilakukan dalam suasana asam dengan penambahan HCl. Reduksi dengan magnesium dan asam klorida pekat menghasilkan warna kuning kemerahan (jingga) pada ekstrak. Hal ini menunjukkan bahwa pada tanaman alang-alang positif mengandung flavonoid. Senyawa flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar karena mempunyai gugus hidroksil ($-\text{OH}$) tidak tersubstitusi menjadi ikatan hidrogen (Sriwahyuni, 2010). Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Poongothai, 2013).

Steroid merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang mempunyai kerangka siklo pentanoperhidro fenantrena. Senyawa golongan steroid memiliki efek fisiologis, antara lain yang umum dikenal yaitu kolesterol (Tukiran, 2014). Identifikasi steroid positif dikarenakan adanya pereaksi asam asetat glacial dan asam sulfat pekat yang memberikan warna hijau pada hasil akhir pengujian. Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri yaitu dengan merusak membran lipid, sehingga liposom mengalami kebocoran (Madduluri *et al.*, 2013). Steroid juga diketahui dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid, karena sifatnya yang permeabel terhadap

senyawa-senyawa lipofilik menyebabkan integritas membran menurun dan morfologi membran sel terganggu yang mengakibatkan sel mengalami lisis dan rapuh (Ahmed, 2007).

Senyawa fenol adalah senyawa yang memiliki sebuah gugus hidroksil yang terikat langsung pada cincin benzena. Senyawa fenol merupakan antibakteri yang bersifat bakterisidal. Senyawa fenol memiliki aktivitas antimikroba berspektrum luas terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif sehingga senyawa fenol secara intensif dapat digunakan sebagai desinfektan (Oliver *et al.*, 2001). Uji senyawa fenol positif karena adanya reaksi dari FeCl_3 sehingga memberikan warna hijau pada hasil akhir pengujian. Mekanisme antibakteri senyawa fenol dalam membunuh mikroorganisme yaitu dengan mendenaturasi protein sel. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ikatan hidrogen tersebut mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma sebab keduanya tersusun atas protein. Permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma yang terganggu dapat menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel, sehingga sel menjadi lisis (Cushnie *et al.*, 2005).

3. Uji in vitro

Simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dan *S. aureus*. Daya hambat ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam bentuk jamu Meddia Meddwa pada bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* ditandai dengan terbentuknya zona bening di daerah tepian cakram kekuatan antibakteri suatu ekstrak ditentukan oleh luasnya zona hambat yang terbentuk.

Diameter zona hambat bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* berbeda pada setiap perlakuannya. Dosis 6 ppt merupakan dosis terendah yang menghasilkan zona hambat terbesar pada setiap kekuatannya. Dosis 6 ppt menunjukkan bahwa kekuatan antibakteri suatu ekstrak pada dosis tersebut termasuk dalam kategori sedang. Hal ini didukung oleh pendapat Janata *et al.*, (2014) mengatakan bahwa kriteria kekuatan daya antibakteri diameter zona hambat ≤ 5 mm dikategorikan lemah, diameter 5-10 mm dikategorikan sedang, dan diameter 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona hambat ≥ 20 mm dikategorikan sangat kuat. Hal ini juga diperkuat oleh pendapat Taufiq *et al.*, (2015) yang mengatakan bahwa diameter zona hambat yang terbentuk kurang dari 6 mm maka ekstrak tersebut dikategorikan memiliki aktivitas antibakteri.

Konsentrasi yang semakin rendah efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Besarnya zona hambat tidak selalu disebabkan oleh kenaikan konsentrasi ekstrak. Hal ini dikarenakan diameter zona hambat tergantung pada kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar. Kecepatan dapat dipengaruhi oleh perbandingan jumlah pelarut dan zat terlarut. Aquades sebagai pelarut dapat mempercepat proses difusi pada media agar. Apabila konsentrasi tinggi, maka kerapatan molekul antar senyawa antibakteri tinggi sehingga lebih lama berdifusi pada media agar dibandingkan dengan konsentrasi yang rendah (Allo, 2016).

Aktivitas ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam bentuk jamu Meddia Meddwa dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang termasuk bakteri Gram positif lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri *A. hydrophila* yang termasuk bakteri Gram negatif. Hal ini disebabkan karena dinding sel kedua jenis bakteri tersebut berbeda. Ketahanan dinding sel bakteri Gram negatif lebih baik dibandingkan dengan Gram positif. Hal ini diperkuat oleh pendapat Ali *et al.*, (2013) yang mengatakan bahwa bakteri Gram negatif mempunyai struktur dinding sel yang kompleks, dimana tersusun dari 3 lapisan, yaitu lapisan luar yang berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa lipopolisakarida yang mampu menyeleksi zat-zat asing dan bagian dalam berupa peptidoglikan, sedangkan pada bakteri positif memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana dibandingkan dengan bakteri Gram negatif sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk.

Pengukuran kontrol positif dilakukan sebagai pembanding atau tolok ukur dalam menentukan kemampuan ekstrak dalam menghambat aktivitas bakteri. Dalam pegujian ini, kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik penisilin. Hasil pengamatan kontrol positif bakteri *A. hydrophila* terdapat zona hambat rata-rata 13.03 mm, dan rata-rata 5.06 mm pada bakteri *S. aureus*. Besarnya zona hambat yang dihasilkan oleh antibiotik tidak sebanding dengan zona hambat ekstrak kombinasi kencur dan ilalang hal ini dikarenakan kandungan bahan aktif antibiotik penisilin sudah bersifat murni, sedangkan kandungan senyawa aktif dalam kombinasi kencur dan ilalang dalam bentuk jamu Meddia Meddwa belum bersifat murni dan masih banyak campuran dari senyawa-senyawa lain sehingga penghambatan terhadap bakteri belum seefektif seperti antibiotik penisilin. Hal ini diperkuat dengan pendapat Ali *et al.*, (2013) bahwa kandungan minyak atsiri jahe belum bersifat murni

karena terdapat banyak campuran senyawa-senyawa lain sedangkan antibiotik kloramfenikol sudah bersifat murni. Selain itu, pengukuran kontrol negatif juga dilakukan. Pada pengamatan kontrol negatif menggunakan bahan aquades tidak terdapat zona hambat. Hal ini dikarenakan aquades tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji yang digunakan.

Kemampuan suatu ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri ditentukan oleh golongan senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh ekstrak tersebut (Ajizah, 2004). Dalam penelitian ini aktivitas antimikroba ekstrak kombinasi kencur dan ilalang dalam bentuk jamu Meddia Meddwa disebabkan karena adanya kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, dan fenol hidrokuinon. Kencur dan ilalang terbukti mengandung senyawa aktif yang berfungsi sebagai antibakteri. Poeloengan *et al.*, (2010) mengatakan bahwa kencur mengandung komponen fitokimia yang berupa tannin, alkaloid, flavonoid, dan saponin yang merupakan senyawa bioaktif yang berperan sebagai antibakteri. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kencur dan ilalang berperan sebagai antibakteri (Poeloengan dan Praptiwi, 2010).

Mekanisme penghambatan bakteri oleh senyawa antibakteri yang terkandung pada ekstrak kombinasi kencur dan ilalang yaitu dengan merusak dinding sel sehingga mengakibatkan lisis. Kemudian terjadi perubahan permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrisi dari dalam sel, mendenaturasi protein serta penghambatan kerja enzim intraseluler sehingga terjadi kerusakan sistem metabolisme didalam sel (Poeloengan *et al.*, 2006).

4. Uji pewarnaan gram

Pewarnaan gram pada bakteri *A. hydrophila* menunjukkan bahwa bakteri uji merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk basil (batang) pendek, tidak berkelompok, dan berwarna merah atau pink sedangkan pada bakteri *S. aureus* merupakan bakteri Gram Positif dengan bentuk kokus (bulat), berkelompok seperti anggur, dan berwarna ungu (Gambar 12). Hal ini diperkuat dengan pendapat Austin dan Austin (2007) mengatakan bahwa *A. hydrophila* merupakan bakteri yang bersifat Gram negatif, mempunyai morfologi batang pendek dengan ukuran bervariasi antara lebar 0.8 -1.0 mikron dengan panjang 1.0-3.5 mikron, tidak memiliki spora, bakteri bersifat motil karena mempunyai flagela monotrichous. Morfologi koloni permukaannya

agak menonjol, berbentuk bulat, mengkilat, tepi koloni entire, diameter 2-3 mm. *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif, non motil, tidak berspora, berbentuk kokus dan tersusun seperti buah anggur (Atyah *et al.*, 2010).

Pada proses pewarnaan gram, bakteri Gram positif bewarna ungu sedangkan bakteri Gram negatif bewarna pink. Hal ini karena bakteri Gram positif mampu mempertahankan zat warna kristal violet sedangkan bakteri Gram negatif tidak. Hal ini sejalan dengan pendapat Madingan *et al.*, (2006) bahwa sifat bakteri Gram positif adalah bakteri yang mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan gram sehingga bewarna ungu bila diamati sedangkan bakteri Gram negatif bewarna merah atau pink. Disisi lain, bakteri Gram negatif bewarna merah atau pink. Bakteri yang menyerap zat kristal violet tetap bewarna ungu setelah pelunturan dengan alkohol disebut bakteri Gram positif sedangkan bakteri yang warna ungunya luntur pada pencucian dengan alkohol, menyerap zat warna safranin sehingga bewarna merah muda sehingga disebut bakteri Gram negatif (James *et al.*, 2008).

5. Kurva pertumbuhan bakteri

Pertumbuhan adalah meningkatnya jumlah kuantitas massa sel dengan cara terbentuknya sel-sel baru. Terjadinya proses pertumbuhan tergantung dari kemampuan sel dalam membentuk protoplasma baru dari *nutrient* yang tersedia di lingkungan. Pertumbuhan bakteri terjadi secara asexual yaitu dengan pembelahan biner. Pembelahan biner berlangsung dengan interval yang teratur dengan penambahan atau kelipatan secara eksponensial (Lestari dan Hardisari, 2019).

Bagi organisme uniselular, absorbance adalah proporsi jumlah sel maupun berat sel. Turbiditas dapat dibaca pada alat ini sehingga digunakan sebagai pengganti untuk menghitung koloni bakteri. Teknik turbidometri secara khusus digunakan untuk menentukan massa sel selama pertumbuhan, sebagai evaluasi terhadap efek zat antibakteri terhadap bakteri (Ristiati, 2015).

Berdasarkan pengujian yang dilakukan didapatkan hasil bahwa pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* mengikuti suatu pola pertumbuhan berupa kurva pertumbuhan sigmoid (kurva normal). Pada kurva pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* fase lag terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-8, fase eksponensial jam ke-10 sampai jam ke-18, fase stasioner jam ke 20, dan fase kematian terjadi pada jam ke-22 sampai jam ke-24 (Gambar 12). Sedangkan pada kurva pertumbuhan bakteri *S. aureus* fase lag terjadi pada jam ke-0 sampai jam

ke-4, fase eksponensial jam ke-6 sampai jam ke-18, fase stasioner jam ke-20 sampai jam ke-22, dan fase kematian terjadi pada jam ke-24 (Gambar 13). Fase pertumbuhan bakteri mengikuti trend grafik logaritmik dengan persamaan $y = 0.8016\ln(x) - 0.6103$ dengan nilai $R^2 = 0.7237$ pada bakteri *A. hydrophila*, dan $y = 0.8968\ln(x) - 0.6142$ dengan nilai $R^2 = 0.7873$ pada bakteri *S. aureus*.

Berdasarkan kurva normal pertumbuhan bakteri, terlihat bahwa bakteri mengalami peningkatan kuantitas massa sel dengan terbentuknya sel-sel baru dengan cara membelah menjadi dua sel atau pembelahan biner. Bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* selama pertumbuhan pada medium *Nutrient Broth* menunjukkan respon yang berbeda tiap fasenya. Respon tersebut ditunjukkan dengan perbedaan masa fase adaptasi pada awal pertumbuhan. Fase lag (fase adaptasi) merupakan fase penyesuaian bakteri pada lingkungan yang baru (Riadi, 2016). Lama fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikro organisme pada media sebelumnya.

Pada fase eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya (Riadi, 2016). Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya. Sehingga jumlah bakteri keseluruhan bakteri tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kadar nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik sehingga mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan populasi bakteri (Riadi, 2016).

Fase pertumbuhan bakteri yang digunakan pada uji *in vitro* adalah bakteri adalah bakteri pada fase pertumbuhan eksponensial (*log phase*). Hal ini karena pada fase ini bakteri mengalami pertumbuhan yang optimum. Berdasarkan hasil penelitian mengenai kurva pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* memperlihatkan bahwa fase eksponensial terjadi pada jam ke-10 hingga jam ke-18 dengan peningkatan jumlah mencapai puncaknya pada jam ke-18 sedangkan pada kurva pertumbuhan bakteri *S. aureus* menunjukkan bahwa fase eksponensial terjadi pada jam ke-6

hingga jam ke-18 dengan peningkatan jumlah mencapai puncaknya pada jam ke-18.

Medium pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus* pada uji *in vitro* yang terekspos oleh simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa menunjukkan adanya efek bakteriostatik yang disebabkan oleh kandungan senyawa aktif simplisia kencur dan ilalang. Bakteriostatik memberikan efek dengan cara menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh (Rahmah, 2021). Efek bakteriostatik yang ditimbulkan oleh simplisia kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa dipengaruhi oleh senyawa kimia yang terkandung, yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, dan fenol hidrokuinon. Terjadinya penghambatan tersebut karena adanya reaksi suatu senyawa kimia sebagai antibakteri. Mekanisme penghambatan bakteri oleh senyawa antibakteri yaitu dengan merusak dinding sel sehingga mengakibatkan lisis. Kemudian terjadi perubahan permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrisi dari dalam sel, mendenaturasi protein serta penghambatan kerja enzim intraseluler sehingga terjadi kerusakan sistem metabolisme didalam sel (Poeloengan *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai senyawa aktif kombinasi kencur dan ilalang serta efektivitasnya secara *in vitro* terhadap bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Kandungan senyawa aktif atau fitokimia yang terkandung di dalam jamu Meddia Meddwa berbahan kencur dan ilalang adalah alkaloid, flavonoid, steroid dan fenol hidrokuinon.
2. Kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa memiliki aktivitas antibakteri secara *in vitro* hal ini dilihat dari terbentuknya zona hambat di sekeliling kertas cakram. Zona hambat terbesar sebesar 2.8 mm pada bakteri *A. hydrophila* dan 5.96 mm pada bakteri *S. aureus*.
3. Kombinasi kencur dan ilalang dalam jamu Meddia Meddwa lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif.
4. Perlakuan 6 ppt berpengaruh nyata pada setiap perlakuan tersebut merupakan perlakuan dengan konsentrasi terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus*. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak dengan konsentrasi yang

semakin rendah efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan *S. aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, Y. 2008. *Efektivitas Ekstrak Daun Paci-Paci Leucas lavandulaefolia untuk Pencegahan dan Pengobatan Infeksi Penyakit MAS Motile Aeromonas Septicaemia Ditinjau dari Patologi Makro dan Hematologi Ikan Lele Dumbo Clarias sp.* [Skripsi]. IPB. 148 hlm.
- Adihi, S., Nordan, H., Ningsih S.N. (2017). *Antivitas Antioksidan Dan Antibakteri Ekstrak Daun Keji Beling Terhadap S. aureus dan E. coli.* Pendidikan Kimia. Universitas Bengkulu.
- Afrianto. E., Liviawaty. E., Jamaris. dan Z., Hendi. 2015. *Penyakit Ikan.* Penebar Swadaya. Jakarta.
- Ahmed, Bahar. 2007. *Chemistry Of Natural Products.* New Delhi: Departemen of Pharmaceutical Chemistry of Science. Jamia Hamdard.
- Amalia, R. 2016. *"Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Sangkareho (Callicarpa longifolia Lam.) Terhadap Staphylococcus aureus".* Palangka Raya: KTI Universitas Muhammadiyah Palangkaraya.
- Annisa. (2017). *Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Difeniltimah (IV) di-3-Klorobenzoat dan Trifeniltimah (IV) 3-Klorobenzoat terhadap Bakteri Gram Negatif Pseudomonas aeruginosa dan Gram Positif Bacillus Subtilis.* Tesis. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Atyah, M.A.S., M.Z. Saad and A.S. Zahrah. 2010. First report of methicillin- resistant Staphylococcus aureus from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Microbiology* 144 (2010) 502–504.
- Austin, B. and D.A. Austin. 2007. *Bacterial fish pathogens Disease of Farmed and wild fish,* 4th edition. Springer praxis. Godalming. UK.
- Badan Standarisasi Nasional. 2015. *Standar Nasional Indonesia Identifikasi Bakteri Aeromonas hydrophila Pada Ikan.* SNI No.7303.1:2015. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Barus, R. 2009. *Amidasi Etil P-Metoksisinamat yang diisolasi Dari Kencur (Kaempferia galanga Linn).* Tesis. Universitas Sumatera Utara. Medan. Hal. 23.
- Bhalodia, N.R., Shukla, V.J., 2011. Antibacterial and Antifungal Activities From Leaf Extracts of

- Casia fistula I: An ethnomedical Plant, J. Adv. Pharm Technol Res. Vol: 2 (2), page 104-109.
- Creswell, C. J. Kosasih, P. & Iwang, S. 2005. *Analisi Spektrum Senyawa Organik. Cetakan Ke-10 Edisi Ketiga*. Bandung: Penerbit ITB Hal: 1-10.
- Cushie, T. P dan Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*. 26 (343-356).
- D. Wahjuningrum, Taronu dan S. L. Angka. (2007). *Efektifitas Rebusan Campuran Sambaloto (Andrographis paniculata (Burm.F.) Ness), Daun Jambu Biji (Psidium guajava L.) Dan Daun Sirih (Piper betle L.) Untuk Pencegahan Penyakit Mas (Motil Aeromonas Septicaemia) Pada Ikan Lele Dumbo (Clarias sp.)*. IPB. Bogor.
- Dadang Kurniawan. (2010). *Efektivitas Campuran Tepung Meniran Phyllanthus niruri dan Bawang Putih Allium sativum Dalam Pakan untuk Pencegahan Infeksi Bakteri A. Hydrophila pada Ikan Lele Dumbo Clarias sp.* IPB. Bogor.
- Dadi Pratama S, Agung Supriyadi, dan Budi Raharjo. (2017). *Efektivitas Kombinasi Ekstrak Bahan Herbal (Mengkudu, Pepaya, Kunyit) terhadap Daya Hambat Pertumbuhan A. hydrophila Secara In Vitro*. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Dent M, Uzelac VD, Penic M, Brncic M. The effect of extraction solvent, temperature, and time on the composition and mass fraction of polyphenol in dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extract. *Biotechnol* 2013; 51(1):84-91.
- Depkes RI. 2009. *Materi Medika Indonesia*. Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Indonesia. Hal 549-553.
- Dew, I. S., Saptawati, T., & Rachma, F. A. 2021. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit dan Biji Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.). In *Prosiding Seminar Nasional Unimus* (Vol. 4).
- Dina Selvia Sari, Artini Pangastuti, Elisa Herawati. 2013. *Pencegahan Infeksi Aeromonas hydrophila Pada Ikan Nila (Oreochromis niloticus) Dengan Pemberian Ekstrak Etil Asetat Rimpang Temu Ireng (Curcuma aeruginosa)*. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. Jawa Tengah.
- Gholib D, 2009. *Daya Hambat Ekstrak Kencur (Kaempferia Galanga L.) Terhadap Trichophyton Mentagrophytes Dan Cryptococcus Neoformans Jamur Penyebab Penyakit Kurap Pada Kulit Dan Penyakit Paru*. Balai Besar Penelitian Veteriner. Buletin Littro. Vol. 20 No. 1: 59 – 67.
- Hammad, A.M., W. Watanabe, T. Fujii and T. Shimamoto. 2012. Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and – susceptible Staphylococcus aureus and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *International Journal of Food Microbiology* 156: 286–289.
- Hapsah dan Hasanah. 2011. *Budidaya Tanaman Obat dan Rempah*. Medan: USU Press.
- Harborne, J.B. *Metode Fitokimia Edisi Ke-2*. Bandung: ITB. 2006.
- Hardi, E. H., Gina Saptiani, Nurkadina, Irawan Wijaya Kusuma, Wiwin Suwinarti. (2017). *Uji In Vitro Gabungan Ekstrak Boesenbergia pandurata, Solanum ferox, Zingiber zerumbet terhadap Bakteri Patogen pada Ikan Nila*. Universitas Mulawarman, Samarinda.
- Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. 2010. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 28: 354-361
- Hasan, A. E. Z., Andrianto, D., & Rosyidah, R. A. (2022). Uji Penghambatan α -Glukosidase dari Kombinasi Ekstrak Kunyit, Teh Hitam dan Jahe: The α -Glucosidase Inhibition Test from a Combination of Turmeric Extract, Black Tea, and Ginger. *Jurnal Agroindustri Halal*, 8(1), 137-146.
- Kurniawan, A., Basorudin, A., & Prasetyono, E. 2022. Fortifikasi Ekstrak Limbah Kulit Buah Melinjo (Gnetum gnemon) Pada Pakan Terhadap Warna Ikan Mas Koki (Carassius auratus). *Jurnal Perikanan Pantura (JPP)*, 5(1), 148-155.
- Kusdarwati, R., Kurniawan, H., & Prayogi, Y. T. 2017. Isolation and identification of *Aeromonas hydrophila* and *Saprolegnia* sp. on catfish (*Clarias gariepinus*) in floating cages in Bozemo Moro Krembangan Surabaya. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 55 (1).
- Lestari, P., & Hardisari, R. N. R. 2019. Perbedaan Angka Kuman Udara Sebelum dan Sesudah Penyinaran Lampu Ultraviolet 90 Watt di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analisis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. Poltekkes Kemenkes Yogyakarta.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2012. Pelacakan Gen Aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas yang doberi Pakan Ekstrak Bawang Putih. *Jurnal Veteriner*. 13 (1): 43 – 50.
- Mulia, D.S., C.Purbomartono, & J.R.Wulandari, 2009. Optimasi Dosis Protein Sitoplasma Sel

- Aeromonas hydrophila untuk Pengendalian Penyakit MAS (Motile Aeromonas Septicemia) pada Gurami (*Osporonemus gouramy* Lac.). *Sains Akuatik. Jurnal Ilmu-ilmu Perairan*, 12(1):27 – 38.
- Poeloengan, M., Chairul, I. Komala, S.Salmah dan M. N.N Susan. 2006. Aktivitas Antibakteri dan Fitokimia Dari Beberapa Jenis Tanaman Obat. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Bogor. Hal. 300-305.
- Salim, M., Yahya, Sitorus, H., Marini, T.N. 2016. Hubungan Kandungan Hara Tanah dengan Produksi Senyawa Metabolit Sekunder pada Tanaman Duku (*Lansium domesticum* Corr var Duku) dan Potensinya sebagai larvasida. *Jurnal Vektor Penyakit Badan Litbang Kesehatan*. 10.(1): 11-18.
- Santoso, J., S. Anwariah. R. O. Rumiantin, A. P. Putri, N. Ukhty and Y. Yoshie-Stark. 2012. Phenol Conten. Antioxidan Activity and Fibers profile of Four Tropical Seagrasses From Indonesia. *Journal Of Medical Plants*, 10 (37): 73-79.
- Sartinah, A. 2011. Isolasi dan identifikasi senyawa antibakteri dari daun petai cina (*leucaena leucocephala* (Lam.) De wit.) Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada.
- Seniwaty, Raihana, Ika Kusuma Nugraheni, Dewi Umaningrum. 2009. Skrining Fitokimia Dari Alang-Alang (*Imperata Cylindrica* L.Beauv) Dan Lidah Ular (*Hedyoti Corymbosa* L.Lamk). Fmipa Universitas Lambung Mangkurat. Banjarbaru.
- Rahmah, M. H. 2021. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksan dari Ekstrak Daun Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella* sp. *SAINTIFIK*, 7(2), 96-103.
- Ristiati, N. P. 2015. Uji bioaktivitas Forbazol E terhadap hambatan pertumbuhan pada *Staphylococcus aureus*. *JST (Jurnal Sains dan Teknologi)*, 4(1).
- Seniwaty, S., Raihanah, R., Nugraheni, I. K., & Umaningrum, D. 2009. Skrining fitokimia dari alang-alang (*Imperata cylindrica* L. Beauv) dan lidah ular (*Hedyotis corymbosa* L. Lamk). *Jurnal Ilmiah Berkala Sains dan Terapan Kimia*, 3(2), 124-133.
- Sudarmi, S., Subagyo, P., Susanti, A., & Wahyuningsih, A. S. 2015. Ekstraksi sederhana antosianin dari kulit buah naga (*hylocereus polyrhizus*) sebagai pewarna alami. *International Journal Of Renewable Energt Development*, 12(1).
- Taufiq, S., Y. Umi, dan H. Siti. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*Carica papaya*) Terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Prosiding Penelitian Spesia UNISBA*.
- Utomo, P. P., & Supriyatna, N. 2014. Perbandingan daya proteksi losion anti nyamuk dari beberapa jenis minyak atsiri tanaman pengusir nyamuk. *Biopropal Industri*, 5(2), 79-84.