

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan Bakteriosin *Bifidobacterium longum* terhadap *Salmonella typhi*

Antibacterial Activity Of Temulawak Extract (*Curcuma xanthorrhiza*) and *Bifidobacterium longum* Bacteriocin Against *Salmonella typhi*

Vinsa Cantya Prakasita^{1*}, Jessica Ilham¹ dan Charis Amarantini¹

¹Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

Abstrak

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* yang menyerang sistem pencernaan. Infeksi *Salmonella* ini menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang signifikan di seluruh dunia. Penyakit ini dapat diatasi dengan antibiotik, namun saat ini sudah banyak terjadi resistensi antibiotik sehingga penggunaannya kurang efektif. Temulawak merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional di Indonesia yang memiliki banyak manfaat kesehatan. Bacteriocin memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas daya hambat ekstrak etanol temulawak dan bakteriosin *Bifidobacterium longum* terhadap pertumbuhan *S. typhi*. Ekstraksi temulawak dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol. Skrining fitokimia dengan berbagai reagen dilakukan untuk mengetahui senyawa yang ada di dalamnya. Kadar total fenolik diukur dengan menggunakan persamaan regresi yang dibandingkan dengan asam galat. Bakteriosin *B. longum* diperoleh dengan cara menambahkan NaOH pada supernatan hasil panen dan memanaskannya pada suhu tinggi. Uji aktivitas daya hambat ekstrak etanol temulawak (EET) dan bakteriosin *B. longum* (BBI) dilakukan dengan metode difusi disk. EET mengandung alkaloid, saponin, terpenoid, flavonoid, dan fenol dengan kadar total fenol $30,73 \pm 2,81 \text{ mg GEA/g}$. EET memiliki aktivitas daya hambat yang rendah hingga sedang, sedangkan BBI memiliki aktivitas daya hambat yang rendah terhadap *S. typhi*.

Kata Kunci: antibakteri, bakteriosin *Bifidobacterium longum*, ekstrak etanol temulawak, *Salmonella typhi*

Abstract

Typhoid fever is an infectious disease caused by *Salmonella typhi* that attacks the digestive system. This *Salmonella* infection leads to significant morbidity and mortality worldwide. The disease can be treated with antibiotics, but antibiotic resistance has become widespread, making their use less effective. Turmeric is one of the plants used as traditional medicine in Indonesia with many health benefits. Bacteriocin has antimicrobial activity against pathogenic bacteria. Therefore, this study aims to determine the inhibitory activity of turmeric ethanol extract and *Bifidobacterium longum* bacteriocin against the growth of *S. typhi*. Turmeric extraction was performed using the maceration method with ethanol as the solvent. Phytochemical screening with various reagents was conducted to identify the compounds present. The total phenolic content was measured using a regression equation compared to gallic acid. *B. longum* bacteriocin was obtained by adding NaOH to the harvested supernatant and heating it at a high temperature. The inhibitory activity of turmeric ethanol extract (TEE) and *B. longum* bacteriocin (BBI) was tested using the disk diffusion method. TEE contains alkaloids, saponins, terpenoids, flavonoids, and phenols with a total phenolic content of $30.73 \pm 2.81 \text{ mg GAE/g}$. TEE has low to moderate inhibitory activity, while BBI has low inhibitory activity against *S. typhi*.

Keywords: antibacterial, *Bifidobacterium longum* bacteriocin, turmeric ethanol extract, *Salmonella typhi*.

***Corresponding author:**

Vinsa Cantya Prakasita
Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana,
Jl. Wahidin Sudirohusodo 5-25, Yogyakarta 55224
Email: vinsa.cantya.p@staff.ukdw.ac.id

Pendahuluan

Demam tifoid merupakan penyakit yang menginfeksi sistem pencernaan. Kontaminasi *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) pada makanan merupakan penyebab terbesar dari penularan penyakit tersebut. Selain melalui makanan, penularan juga dapat melalui kontak dengan feses, muntah, dan dari serangga seperti lalat yang hidup di lingkungan kotor sehingga membawa bakteri tersebut ke makanan (Levani & Prastya, 2020; WHO, 2018). Gejala yang timbul dari penyakit tersebut adalah demam yang terjadi dengan durasi waktu yang panjang, diare, mual dan muntah. Kejadian kronis dari penyakit demam tifoid juga dapat ditandai dengan perdarahan yang merupakan akibat dari komplikasi gastrointestinal (Ashurst *et al.*, 2018).

Infeksi *Salmonella* ini menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang signifikan di seluruh dunia. Berdasarkan data dari WHO (2018), tercatat ada 21 juta kasus yang terjadi di dunia dan menyebabkan 128.000-161.000 kematian pasien. Pada tahun 2019, kejadian demam tifoid diketahui terdapat 9 juta kasus dan 110.000 kematian pasien (WHO, 2019). Di Indonesia, jumlah penderita demam tifoid masih tinggi, yaitu pada 100.000 penduduk, dapat terjadi kemungkinan kejadian penyakit sebanyak 350-810 orang. Kasus tersebut menduduki urutan ke-5 penyakit menular dengan prevalensi sebesar 1,6% di Indonesia (Kemenkes RI, 2021). Perparahan penyakit pada kasus demam tifoid terjadi karena kebiasaan hidup dari masyarakat yang berkaitan dengan kebersihan. Makanan yang tidak higienis, tidak matangnya dalam memasak makanan, dan lingkungan yang kotor dapat menyebabkan tingginya tingkat keparahan yang dialami (Kemenkes RI, 2018).

Antibiotik seperti ciprofloxacin, ceftriaxone dan azitromisin merupakan treatment obat yang direkomendasikan untuk demam tifoid (Chang *et al.*, 2019; NICD, 2022). Pengobatan tersebut seringkali mengakibatkan efek samping seperti pusing, mual muntah, sesak napas hingga shock anafilaktik (Lendon & Sternard, 2023). Berdasarkan Rahati *et al.*, (2022), penggunaan obat komersial juga membutuhkan biaya

yang cukup besar, seperti penggunaan antibiotik ciprofloxacin dalam sediaan infus memerlukan biaya hingga jutaan rupiah. Penggunaan antibiotik juga tidak menutup kemungkinan adanya kejadian resistensi antibiotik yang menyebabkan semakin kuatnya infeksi bakteri serta dapat meningkatkan risiko komplikasi dan kematian. Dilihat dari sisi ekonomi, kasus resistensi antibiotik juga memerlukan perawatan yang lebih intensif dan tentunya mahal (Crump *et al.*, 2004; WHO, 2014; OECD, 2016). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mencari alternatif pengobatan dari demam tifoid.

Temulawak (*Curcuma zanthorriza*) merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai tanaman obat unggulan Indonesia (Kemenkes RI, 2023). Temulawak diketahui memiliki banyak manfaat kesehatan. Manfaat tersebut didapatkan melalui senyawa fitokimia yang terdapat dalam temulawak. Kandungan fitokimia seperti kurkuminoid memiliki manfaat sebagai antibakteri, antikanker, antitumor dan antioksidan. Pemberian kurkumin mampu mengubah perbandingan mikrobiota pencernaan. Kurkumin meningkatkan jumlah Bifidobacterial, Lactobacilli, dan bakteri penghasil butirir serta menurunkan jumlah Prevotellaceae, Coriobacteriaceae, Enterobacteria, dan Enterococcus patogen (Rahmat *et al.*, 2021; Zam, 2018). Selain kandungan kurkuminoid, kandungan alkaloid, tanin terpenoid dan khususnya flavonoid dapat berperan sebagai antibakteri (Heinrich, 2009). Prakasita *et al.* (2019) membuktikan bahwa ekstrak etanol temulawak dengan konsentrasi 3.13% mampu menghambat dan membunuh *Salmonella enteritidis*. Ketersediaan temulawak di Indonesia diketahui sangat melimpah. Temulawak sangat mudah tumbuh di lingkungan dengan iklim tropis. Berdasarkan Badan Pusat Statistik (BPS) (2022), panen temulawak di Indonesia mencapai 28.099.702 kilogram temulawak. Temulawak juga terkenal ekonomis dibanding rimpang-rimpang sejenis lainnya, sehingga dapat dijangkau semua kalangan (Hidayah *et al.*, 2019).

Beberapa peneliti telah mengembangkan bakteri asam laktat yang dikenal sebagai agen biokontrol yang bermanfaat bagi manusia terhadap bakteri patogen. Penelitian oleh Arboleya *et al.* (2016) menunjukkan bahwa *Bifidobacterium longum* secara alami berada pada saluran pencernaan manusia dan ditemukan pada semua rentang usia (bayi hingga lansia). Beberapa studi melaporkan produksi zat antimikroba, bacteriocin, dalam strain *Bifidobacterium*. Bacteriocin memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen, baik kelompok Gram-positif maupun Gram-negatif (Desmukh & Thorat, 2013). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas daya hambat ekstrak etanol temulawak dan bakteriosin *Bifidobacterium longum* terhadap pertumbuhan *Salmonella typhi*.

Materi Dan Metode

Sampel Bakteri

Salmonella typhi diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, sedangkan *Bifidobacterium longum* FNCC 0210 diperoleh dari Pusat Studi Pangan dan Gizi (PAU), Universitas Gadjah Mada (UGM).

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain temulawak yang didapat dari salah satu kebun organik di Bantul dan etanol 96% untuk melakukan ekstraksi etanol temulawak. Aquades sebagai pelarut, kontrol negatif, blanko dan bahan sterilisasi basah. Pengujian fitokimia diperlukan larutan H_2SO_4 pekat, asam asetat, NaOH 10%, HCl pekat, pita Mg, reagen Mayer, reagen Dragendrof, $FeCl_3$ 1% dan kloroform. Pada pengujian antibakteri diperlukan 2 isolat bakteri yaitu *Salmonella typhi* sebagai bakteri patogen, yang didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta dan *Bifidobacterium longum* FNCC 0210 sebagai probiotik yang didapatkan dari Pusat Studi Pangan dan Gizi UGM (PAU, Yogyakarta). Pada tahap aktivasi isolat bakteri diperlukan medium *de Mann Rogosa Sharpe* broth (Merck) dan 1% $CaCO_3$ sebagai indikator pertumbuhan bakteri asam laktat serta medium *Brain Hearth Infusion* (BHI)

broth (Merck) sebagai medium pertumbuhan bakteri patogen. Uji konfirmasi isolat bakteri secara makroskopis dibutuhkan medium selektif MRS Agar (Merck) untuk bakteri asam laktat dan *Salmonella Shigella Agar* (SSA) (Merck) untuk bakteri genus *Salmonella*. Uji konfirmasi bakteri secara mikroskopis dengan pengecatan gram dibutuhkan cat gram A (kristal violet), cat gram B (lugol), cat gram C (iodine), cat gram D (safranin) serta minyak emersi dan pembersih lensa. Pengujian antibakteri dibutuhkan kertas saring whatmann 42, medium *Mueller-Hinton Agar* (Difco) dan medium *Nutrient Agar* (Merck) sebagai medium uji aktivitas antibakteri, larutan standar *McFarland 0.5*, ciprofloxacin sebagai kontrol positif dan *blank disc* (Oxoid).

Ekstraksi Temulawak

Ekstraksi temulawak dilakukan dengan metode maserasi, dengan pelarut etanol 96% (1:3 b/v) dan dilanjutkan dengan proses remaserasi sebanyak 3 kali. Hasil maserat yang didapat dilakukan dengan proses evaporasi untuk memisahkan senyawa metabolit pada temulawak dengan etanol, sehingga didapatkan ekstrak kental temulawak (Depkes RI, 2000).

Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

Skrining fitokimia digunakan untuk mengidentifikasi senyawa antibakteri dari temulawak, seperti alkaloid, saponin, terpenoid, flavonoid, dan fenol dengan reagen. Skrining fitokimia alkaloid dilakukan dengan menimbang ekstrak masing-masing 0,1 g ke dalam 2 tabung reaksi dan dilarutkan dalam 1 ml aquades. Tabung pertama ditambahkan reagen wagner sebanyak 5 tetes dan tabung kedua ditambahkan reagen mayer. Uji positif ditunjukkan ketika terdapat perubahan warna menjadi kecoklatan pada reagen wagner dan timbul endapan pada reagen mayer (Harbone, 1987).

Skrining fitokimia saponin dilakukan dengan menimbang 0,1 g ekstrak, kemudian ditambahkan 5 ml air panas dan dikocok kuat. Uji positif saponin ditunjukkan dengan adanya busa yang terbentuk dengan tinggi

1-3 cm dengan kisaran waktu 10 menit (Supomo *et al.*, 2016).

Skrining fitokimia terpenoid dilakukan dengan menimbang 0,1 g ekstrak, kemudian dilarutkan dalam 1 ml aquades dan ditambahkan 1-2 tetes H_2SO_4 . Uji positif terpenoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi merah atau jingga (Harbone, 1987).

Skrining fitokimia flavonoid dilakukan dengan menimbang 0,1 g ekstrak yang dilarutkan dalam 1 ml aquades dan ditambahkan 2 tetes HCl. Setelah dikocok kuat, ditambahkan 0,1 g serbuk Mg. Uji positif flavonoid ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi merah (Harbone, 1987).

Skrining fitokimia fenol dilakukan dengan menimbang 0,1 g ekstrak yang dilarutkan dalam 1 ml aquades, kemudian ditambahkan $FeCl_3$ sebanyak 3 tetes. Uji positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi biru kehitaman (Harborne, 1996).

Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

Sebanyak 50 mg asam galat ditambahkan dengan 1 ml etanol 96% dan 49 ml akuades. Dari larutan stok diambil sebanyak 1 ml; 1.25 ml; 1.5 ml; 1.75 ml dan 2 ml, kemudian dilarutkan dalam akuades sampai volume akhir menjadi 10 ml sehingga konsentrasinya menjadi 100, 125, 150, 175 dan 200 $\mu g/ml$. Masing-masing konsentrasi diambil 0.2 ml dan dicampurkan dengan 15.8 ml akuades dan 1 ml reagen *Folin-Ciocalteu* kemudian dihomogenkan. Campuran tersebut didiamkan selama 8 menit, ditambahkan dengan Na_2CO_3 10% dan dihomogenkan. Campuran didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar, kemudian diukur dengan spektrofotometri dengan panjang gelombang 765 nm (Waterhouse, 1999; Marjoni *et al.*, 2015).

Sebanyak 1000 mg ekstrak diambil dan ditambahkan dengan 10 ml akuades. Dari campuran tersebut diambil 1 ml dan ditambahkan dengan 9 ml akuades. Larutan diambil sebanyak 0.2 ml dan ditambahkan dengan 15.8 ml akuades serta reagen 1 ml

Folin-Ciocalteu. Larutan dihomogenkan dan didiamkan selama 8 menit. Larutan didiamkan dan ditambahkan dengan Na_2CO_3 10%, dan dihomogenkan. Campuran didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar kemudian diukur dengan spektrofotometri dengan panjang gelombang 765 nm (Orak, 2006; Marjoni *et al.*, 2015). Rumus perhitungan kadar total fenol (Saptari *et al.*, 2019)

$$TPG = \frac{C \times V \times fp}{B}$$

Keterangan= C : Konsentrasi total fenol ($\mu g/ml$); V : Volume (ml); Fp : faktor pengenceran; B : berat sampel ekstrak yang digunakan (gram)

Peremajaan dan Konfirmasi Isolat *Bifidobacterium longum* FNCC 0210 dan *Salmonella typhi*

Isolat *B. longum* di kultur dalam medium *de Man-Rogosa-Sharpe* (MRS) broth dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam secara anaerob. Bakteri indikator (*S. typhi*) ditumbuhkan dalam medium *Brain Hearth Infusion* (BHI) broth pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Konfirmasi dilakukan pada isolat *B. longum* FNCC 0210 dan *S. typhi* berdasarkan pengamatan morfologi dan pewarnaan Gram (Suardana *et al.*, 2008)

Preparasi Cell-Free Culture Supernatant (CFCS) *Bifidobacterium longum*

Isolat *B. longum* yang telah diremajakan dipanen dengan cara disentrifugasi. Supernatan diambil dan ditambahkan NaOH sehingga pH akhir menjadi 6.5, kemudian dipanaskan pada suhu tinggi 100°C selama 10 menit untuk mengisolasi bakteriosin (Ramos *et al.*, 2013; Baloch *et al.*, 2015).

Aktivitas Daya Hambat Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dan Bakteriosin *Bifidobacterium longum* terhadap *Salmonella typhi*

Uji daya hambat dilakukan dengan metode difusi agar. Bakteri indikator yang telah diremajakan diinokulasikan di atas permukaan media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kepadatan sel *S. typhi* yang digunakan setara dengan larutan standar

McFarland 0.5. Blank disk disiapkan di dalam cawan petri kosong dan diteteskan dengan masing-masing variasi konsentrasi ekstrak temulawak sebanyak 20 µL sampai terserap dengan baik. Adapun konsentrasi yang digunakan terdiri dari 100%, 50%, 25%, 12.5% dan 6.25% (Prakasita *et al.*, 2019).

Kontrol positif menggunakan ciprofloxacin dan kontrol negatif menggunakan akuades steril. Untuk pengujian daya hambat dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Masing-masing disk diletakkan pada media MHA yang sudah berisi bakteri indikator. Media diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Penghambatan yang terbentuk ditandai dengan adanya zona terang sekitar kertas cakram yang diukur diameternya dalam satuan milimeter (Dicky & Apriliana, 2016). Kemampuan daya hambat dibedakan menjadi 4 kategori yaitu kategori lemah dengan diameter ≤ 5 mm, sedang dengan diameter 5-10 mm, kuat dengan diameter 10-20 mm dan sangat kuat dengan diameter ≥ 20 mm (Davis & Stout, 1971; Faradina *et al.*, 2019).

Hasil

Skrining fitokimia merupakan metode kualitatif yang dapat dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa fitokimia pada temulawak. Uji fitokimia dilakukan dengan memberikan beberapa tambahan reagen dan bahan kimia untuk melihat perubahan warna yang terjadi pada sampel. Hasil skrining fitokimia temulawak diketahui bahwa terdapat senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, dan terpenoid (Tabel 1).

Optical density (OD) larutan standar menggunakan konsentrasi 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm, dan 200 ppm diukur untuk dasar perbandingan kadar total fenol (Tabel 2). Pengukuran kadar total fenol pada ekstrak temulawak didapat dari persamaan regresi OD larutan standar dan sampel.

Hasil replikasi pengukuran total fenol menunjukkan bahwa nilai OD berada di rentang 0,164-0,230 (Tabel 3). Nilai total fenol pada replikasi pertama yaitu 187,50 µg/ml, kedua 173,75 µg/ml, dan replikasi ketiga yaitu 215 µg/ml. Nilai absorban y dengan

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Temulawak Secara Kualitatif

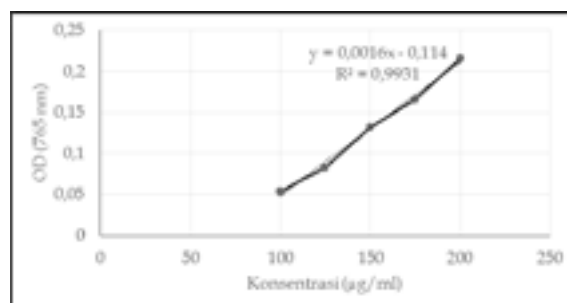
Pengujian	Reagen	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Mayer	+	Ada
	Wagner	+	Ada
Saponin	Akuades	+	Ada
Flavonoid	Mg + HCl	+	Ada
Terpenoid	H ₂ SO ₄	+	Ada
Fenol	NaCl + FeCl ₃	-	Tidak Ada

Tabel 2. Optical Density Larutan Standar Asam Galat pada Panjang Gelombang 765 nm dengan Spektrofotometer UV-Vis

Konsentrasi (µg/ml)	OD (765 nm)
100	0.054
125	0.083
150	0.132
175	0.166
200	0.216

Tabel 3. Kadar Total Fenolik Ekstrak Etanol Temulawak

Replikasi	OD (765 nm)	Konsentrasi Total Fenol (µg/ml)	Mean kadar Total Fenol (mg ^{GEA} /g)
1	0.186	187.50	30.73 ± 2.81
2	0.164	173.75	
3	0.230	215.00	



Gambar 1. Hubungan Antara Konsentrasi dan Optical Density Larutan Standar Asam Galat

persamaan $y=ax-b$ dari pengukuran kurva kalibrasi dan disubstitusikan dengan nilai x . Hasil yang didapatkan dihitung menggunakan rumus perhitungan kadar total fenol (Gambar 1). Kadar fenol yang didapatkan melalui ketiga replikasi dalam ekstrak temulawak adalah $30,73 \pm 2,81$ mg^{GEA}/g.

Hasil uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram menunjukkan bahwa ekstrak etanol temulawak memiliki daya hambat terhadap *Salmonella typhi* (Tabel 4). Hal ini ditunjukkan



Gambar 2. Aktivitas Daya Hambat Ekstrak Etanol Temulawak terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi* dengan Metode Difusi Cakram; 1) akuades steril, 2) ciprofloxacin, 3) konsentrasi ekstrak 100%, 4) konsentrasi ekstrak 50%, 5) konsentrasi ekstrak 25%, 6) konsentrasi ekstrak 12.5% dan 7) konsentrasi ekstrak 6.25%

melalui adanya diameter zona hambat yang berwarna jernih di sekitar *disk* (Gambar 2). Hasil pengukuran diameter zona hambat menunjukkan adanya daya antibakteri dari temulawak. Semakin besar diameter, maka kemampuan dalam menekan pertumbuhan bakteri semakin baik. Berbeda dengan ekstrak etanol temulawak, bakteriosin memiliki daya hambat yang lemah terhadap *Salmonella typhi* (Tabel 5). Hal ini ditunjukkan melalui tidak



Gambar 3. Aktivitas Daya Hambat Bakteriosin *Bifidobacterium longum* FNCC 0210 terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi* dengan Metode Difusi Cakram; 1) akuades steril, 2) ciprofloxacin, 3) konsentrasi 100%, 4) konsentrasi 50%, 5) konsentrasi 25%, 6) konsentrasi 12,5% dan 7) konsentrasi 6,25%

adanya zona hambat yang berwarna jernih di sekitar *disk* (Gambar 3).

Pembahasan

Ekstraksi dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

Ekstraksi temulawak dilakukan dengan metode maserasi yakni perendaman bubuk temulawak di dalam pelarut etanol 96% selama 72 jam. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang paling sederhana

Tabel 4. Aktivitas Daya Hambat Ekstrak Etanol Temulawak terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*

	Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori Zona Hambat
Konsentrasi Ekstrak (%) (v/v)	100.00%	8.33 ± 1.15 ^{ab}	Sedang
	50.00%	8.00 ± 1.73 ^{ab}	Sedang
	25.00%	9.50 ± 1.32 ^{ab}	Sedang
	12.50%	7.67 ± 0.28 ^{ab}	Sedang
	6.25%	6.67 ± 0.57 ^{ab}	Sedang
	Kontrol Positif	19.67 ± 0.57 ^b	Kuat
	Kontrol Negatif	0.00 ± 0.00 ^a	Lemah

Keterangan: ^aHasil rata-rata antara ekstrak dan kontrol positif berbedanya nyata ($p < 0.05$), ^bHasil rata-rata antara ekstrak dan kontrol negatif berbeda nyata ($p < 0.05$).

Tabel 5. Aktivitas Daya Hambat Bakteriosin *Bifidobacterium longum* FNCC 0210 terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*

	Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)	Kategori Zona Hambat
Konsentrasi Bakteriosin (%) (v/v)	100.00%	0.00 ± 0.00	Lemah
	50.00%	0.00 ± 0.00	Lemah
	25.00%	0.00 ± 0.00	Lemah
	12.50%	0.00 ± 0.00	Lemah
	6.25%	0.00 ± 0.00	Lemah
	Kontrol Positif	23.00 ± 1.00	Sangat Kuat
	Kontrol Negatif	0.00 ± 0.00	Lemah

dengan merendamkan serbuk dalam pelarut yang sesuai selama beberapa hari pada suhu ruang yang terlindungi dari cahaya. Prinsip kerja dari ekstraksi ini ialah pelarut akan masuk ke dalam sel melalui penembusan dinding sel, sehingga kandungan di dalam sel akan larut bersama dengan pelarut (Dicky & Apriliana, 2016). Pelarut etanol 96% akan memudahkan dalam mendapatkan ekstrak karena sifatnya mudah menguap tanpa mengubah jumlah ekstrak. Pelarut selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* dan oven hingga ekstrak menjadi kental. Menurut Widyawati *et al.* (2014), pelarut etanol mampu melarutkan senyawa fitokimia yang bersifat polar seperti senyawa fenolik, flavonoid, asam amino, senyawa glikosida, gula, antosianin, terpenoid, saponin, tanin, flavon, dan polifenol. Etanol terdiri dari 2 gugus fungsi yakni gugus hidroksil (-OH) sebagai gugus polar dan gugus C_2H_5 sebagai gugus non-polar, sehingga pelarut etanol mampu melarutkan senyawa antimikrobia yang bersifat polar dan non-polar (Hart *et al.*, 2003). Efektifitas ekstraksi senyawa fitokimia sangat dipengaruhi dengan sifat kelarutan senyawa tersebut dalam pelarut atau dikenal dengan prinsip *like dissolves like* dimana prinsip tersebut menyatakan bahwa pelarut polar dapat melarutkan senyawa yang bersifat polar demikian pula sebaliknya (Arsa & Achmad, 2020).

Uji skrining fitokimia dilakukan dengan tujuan agar dapat mengetahui kandungan fitokimia apa saja yang bersifat sebagai antibakteri di dalam ekstrak etanol temulawak. Menurut Rukmana (2004), kemampuan tumbuhan *Curcuma* dalam menghambat pertumbuhan mikrobia disebabkan oleh adanya senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin, kurkuminoid dan minyak atsiri. Berdasarkan hasil kelima uji skrining fitokimia, didapati bahwa pada sampel ekstrak etanol temulawak positif mengandung alkaloid, saponin, terpenoid dan flavonid (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan penelitian Halim *et al.* (2012) yang telah menunjukkan bahwa adanya kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin, fenol dan *cardiac glycoside*. Berdasarkan hasil uji

kualitatif dari kelima senyawa tersebut tidak teridentifikasi senyawa fenol pada ekstrak etanol temulawak namun merujuk pada penelitian Halim (2012) bahwa teridentifikasi cukup tinggi kandungan fenol pada ekstrak etanol temulawak, yaitu $199 \pm 1,31$ mg GAE/g. Oleh sebab itu, maka dilakukan uji lanjutan kuantitatif total fenol untuk mengonfirmasi kandungan fenol pada ekstrak etanol temulawak dan mengukur secara kuantitatif kadar total fenol.

Total Kadar Fenol Ekstrak Etanol Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)

Kadar total fenol dapat diukur secara kuantitatif dengan metode *Folin-Ciocalteu* dimana metode tersebut menggunakan larutan standar asam galat sebagai pembanding. Senyawa fenolik terdiri dari fenol sederhana, polifenol, kumarin, tanin, saponin dan flavonoid (Saptari *et al.*, 2019). Adapun asam galat tergolong dalam fenol sederhana yang memiliki kemurnian dan kestabilan yang baik sehingga dapat digunakan sebagai larutan standar (Sam *et al.*, 2020).

Konsentrasi dan nilai absorbansi larutan standar asam galat dapat dilihat pada Tabel 2. Absorpsi maksimum dari asam galat dengan metode spektrofotometri berada pada panjang gelombang 765 nm (Marjoni *et al.*, 2015; Waterhouse, 1999). Dengan adanya kurva standar asam galat maka memudahkan dalam menentukan kadar total fenol pada ekstrak etanol temulawak melalui persamaan regresi linear dari kurva standar (Gambar 1). Gambar 1 menunjukkan adanya hubungan antara konsentrasi dengan nilai *optical density* asam galat dimana semakin tinggi konsentrasinya maka semakin tinggi pula nilai OD. Maka didapatkan persamaan regresi linear larutan standar asam galat $y = 0.0016x - 0,114$ dan nilai $R^2 = 0.9931$.

Perhitungan kadar total fenol sampel ekstrak dilakukan dengan mensubstitusikan nilai OD dengan sumbu y pada persamaan regresi linear larutan standar asam galat. Pada Tabel 3 menunjukkan hasil pengukuran kadar total fenol ekstrak etanol temulawak dengan 3 replikasi sehingga didapatkan rata-rata sebesar 30.73 ± 2.81 GAE/g. Uji

kuantitatif total fenol dapat membuktikan adanya senyawa fenol pada ekstrak etanol temulawak yang pada uji kualitatif tidak terdeteksi. Hasil kadar total fenol memiliki kesesuaian dengan penelitian Halim (2012) yang membuktikan bahwa *Total Phenolic Content* pada ekstrak etanol temulawak merupakan kadar tertinggi kedua setelah *xanthorrhizol* yakni 199 ± 1.31 mg GAE/g sebagai salah satu senyawa terpenoid terbanyak pada ekstrak.

Konfirmasi Strain *Salmonella typhi* dan *Bifidobacterium longum* FNCC 0210

Konfirmasi isolat dilakukan untuk memverifikasi kemurnian isolat *S. typhi* dan *B. longum* sebagai indikator uji. Proses konfirmasi meliputi metode makroskopik dan mikroskopik. Hasil pengamatan makroskopik morfologi koloni yang tumbuh pada media selektif menunjukkan bahwa koloni *S. typhi* berbentuk bulat dan berwarna bening dengan titik hitam di bagian sentralnya, sedangkan koloni *B. longum* berbentuk bulat dan berwarna putih susu dengan zona terang di sekitarnya. Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan pewarnaan Gram dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *S. typhi* berbentuk basil dengan warna merah, sedangkan *B. longum* berbentuk bakteri membentuk huruf "V" atau "Y" dan dengan warna ungu. Hasil morfologi koloni dan sel *S. typhi* sesuai dengan teori Meteab & Abed (2018) dan Batt & Tortorello (2014), begitu pula morfologi koloni dan sel *B. longum* sesuai dengan teori Putri *et al.* (2020).

Aktivitas Daya Hambat Ekstrak Etanol Temulawak terhadap *Salmonella typhi*

Berdasarkan hasil rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan, semua kelompok perlakuan memiliki aktivitas yang berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif dan negatif ($p < 0,05$) (Tabel 4). Ekstrak etanol temulawak 25% memiliki diameter zona hambat terbesar (9.50 ± 1.32 mm) dengan kategori sedang. Aktivitas antibakteri terendah dimiliki oleh ekstrak

etanol temulawak 6,25% dengan diameter zona hambat sebesar 6.67 ± 0.57 mm.

Temulawak memiliki kandungan kandungan senyawa fitokimia alkaloid, steroid, fenol, flavonoid, terpenoid. Masing-masing dari senyawa fitokimia tersebut memiliki manfaat sebagai antibakteri. Senyawa fenol bekerja melalui ikatan hidrogen. Ikatan tersebut mengganggu permeabilitas sel bakteri, sehingga komponen esensial keluar dan perlahan bakteri mengalami kematian (Al-Rubiay *et al.*, 2008). Aktivitas antibakteri sesuai dengan kadar total fenol dalam ekstrak etanol temulawak yang tinggi (Tabel 3) dibandingkan dengan hasil penelitian Akinola *et al.* (2014).

Senyawa flavonoid dapat menghancurkan dinding sel dan menghambat protein *S. typhi*, sehingga lambat laun bakteri mengalami kerusakan sel dan berakhir dengan kematian (Heinrich *et al.*, 2009). Berdasarkan Estrela *et al.* (1995), flavonoid juga memiliki kemampuan untuk mengubah komponen organik bakteri patogen, sehingga dapat merubah mekanisme perpindahan nutrisi bakteri dan menyebabkan kematian. Kandungan senyawa alkaloid memiliki peran dalam mengganggu komponen peptidoglikan pada bakteri, sehingga komponen tersebut rusak dan menghambat bahkan membunuh sel bakteri (Compean & Ynalvez, 2014). Secara keseluruhan, semua senyawa fitokimia pada temulawak dapat menghambat adanya pertumbuhan bakteri. Konsentrasi ekstrak temulawak yang paling baik ditunjukkan pada konsentrasi 25%, dikarenakan komponen senyawa aktif yang ada didalamnya cukup banyak untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Wahyuni & Karim, 2020). Konsentrasi uji lain yang lebih tinggi justru memiliki diameter hambat lebih rendah. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh karena kekentalan atau viskositas yang semakin tinggi. Hal ini menyebabkan senyawa fitokimia sulit untuk berdifusi keluar dan tidak dapat membunuh bakteri dengan efektif, meskipun kandungan senyawa fitokimia lebih tinggi (Bhalekar *et al.*, 2015; Masyithah, 2015).

Aktivitas Daya Hambat Bakteriosin Bifidobacterium longum terhadap Salmonella typhi

Bakteriosin merupakan peptida yang berasal dari Bakteri Asam Laktat (BAL) yang tergolong dalam komponen antimikrobia karena memiliki aktivitas bakterisidal. Bakteriosin merupakan senyawa antimikrobia yang diseksresikan oleh BAL, namun tidak berbahaya bagi bakteri itu sendiri karena bakteri penghasil bakteriosin memiliki imun yang spesifik (Martinez *et al.*, 2013). Bakteriosin diproduksi pada akhir fase eksponensial atau awal fase stasioner yang diakibatkan oleh adanya stress (Riley & Chavan, 2007). Bakteriosin memiliki ketahanan terhadap panas yang tinggi dan stabil pada pH asam maupun netral. Mekanisme inhibisi pertumbuhan mikroba oleh bakteriosin dimulai dengan merusak dinding sel. Dampaknya adalah terhambatnya pertumbuhan atau terjadi lisis pada dinding sel. Bakteriosin mengubah permeabilitas membran pada sitoplasma, menyebabkan nutrisi bocor melalui dinding sel dan kehilangan kekuatan membran serta efluks ATP asam (Meutia, 2011).

Kelima konsentrasi bakteriosin *B. longum* diketahui memiliki perbedaan rata-rata yang nyata dengan kontrol positif, namun tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif. Hasil tersebut menandakan bahwa kelima konsentrasi bakteriosin dari 6.25 - 100% menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan *S.typhi* yang rendah. Hal ini dibuktikan dengan diameter zona hambat yang dihasilkan adalah 0.00 ± 0.00 mm (Tabel 5). Penggunaan metode uji difusi cakram agar hanya terbatas pada uji skrining saja sehingga pengujian yang dilakukan kurang akurat dan tidak bisa mengukur seberapa besar agen antimikrobia mampu berdifusi dengan baik pada media agar, sehingga sangat mempengaruhi hasil dari uji antibakteri (Bolouri *et al.*, 2015). Ketebalan media agar dan kertas cakram juga merupakan faktor penentu kemampuan dari suatu agen antibakteri berdifusi baik ke dalam media agar (Hadi *et al.*, 2019).

Kesimpulan

Ekstrak etanol temulawak memiliki aktivitas hambat terhadap *Salmonella typhi* (rendah-sedang) karena kandungan senyawa fenol, alkaloid, saponin, terpenoid dan flavonoid yang ada di dalamnya. Bakteriosin *Bifidobacterium longum* memiliki aktivitas hambat terhadap *S. typhi* yang rendah. Perlu adanya uji antibakteri lanjutan untuk mengkonfirmasi potensinya sebagai antibakteri terhadap *S. typhi*.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta yang telah memberikan hibah penelitian, sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

Daftar Pustaka

- Akinola, A.A., Ahmad, S., & Maziah, M. (2014). Total anti-oxidant capacity, flavonoid, phenolic acid and polyphenol content in ten selected species of Zingiberaceae rhizomes. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 11(3), 7-13.
- Al-Rubiay, K.K., Jaber, N.N., Al-Mhaawe B.H., & Alrubaiy, L.K. (2008). Antimicrobial Efficacy of Henna Extracts. *Oman Medical Journal*, 23(4), 253-256.
- Arbolea, S., Watkins, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2016). Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Front. Microbiol*, 7, 1-9.
- Arsa, A.K. & Achmad, Z. (2020). Ekstraksi Minyak Atsiri dari Rimpang Temu Ireng (*Curcuma eruginosa* Roxb) dengan Pelarut Etanol dan N-Hexana. *Jurnal Teknologi Technoscintia*, 13 (1), 83-94.
- Ashurst, J.V., Truong, J., & Woodbury, B. (2018). *Salmonella typhi*. Treasure Island. Stat Pearls Publishing.
- Baloch, M. N., Siddiqi, R., Erum, H. & Zia, M. (2015). Exploration of probiotic potential in indigenous lactic acid bacteria. *International Journal of Current Research*, 7(3), 13431-13436.
- Batt, C.A. & Tortorello, M.L. (2014). *Encyclopedia Food Microbiology II*. USA: Elsevier.

- Bhalekar, M.R., Madgulkar, A.R., & Kadam, G.J. (2015). Evaluation of Gelling Agent for Clindamycin Phosphate Gel, *World J. Pharm. Pharmaceutic. Sci.*, 4(7), 2022-2033.
- Bolouri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, K.S. (2015). Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1-10.
- BPS. (2022). *Produksi Tanaman Biofarmaka (Obat) 2020-2022*. Jakarta, Indonesia
- Chang, M.S., Woo, J.H., & Kim, S. (2019). Management of Typhoid Fever—Clinical and Historical Perspectives in Korea. *Infection & chemotherapy*, 51(3), 330-335.
- Compean, K.L. & Ynalvez R.A. (2014). Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review, *Reserach of Medical Plant*. pp. 1-10
- Crump, J.A., Luby, S.P., & Mintz, E.D. (2004). The global burden of typhoid fever. *Bulletin of the World Health Organization*, 82(5), 346-353.
- Davis, W.W., Stout, T.R. (1971). Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Appl Microbiol.* 22(4), 659-665. doi: 10.1128/am.22.4.659-665.1971. PMID: 5002143; PMCID: PMC376382.
- Depkes RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat Cetakan Pertama*. Jakarta: Depkes RI. pp: 9-13.
- Deshmukh, P.V. & Thorat, P.R. (2013). Isolation And Extraction of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated From Raw Milk Samples. *Indian Streams Research Journal*, 9(3), 1-7.
- Dicky, A. & Apriliana, E. (2016). Efek Pemberian Ekstrak Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza Roxb*) terhadap Daya Hambat Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *In Vitro*. *JK Unila*, 1(2), 308-312.
- Estrela, C., Sydney, G.B., Bammann, L.L., & Felipe, Jr. O. (1995). Mechanism of Action Calcium and Hydroxyl Ions of Calcium Hydroxide on Tissue and Bacteria, *Brazil. Dent. J.*, 6(2), 85-90.
- Faradina, A. S., Mastra, N., & Karta, I. W. (2019). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Akar Encok (*Plumbago zeylanica* L.) terhadap Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*. *Jurnal Portelkes*, 7(2).
- Hadi, D.K., Erina, Rinidar, Fakhurrrazi, Rosmaidar, dan Sayuthi, A. (2019). Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Pertumbuhan *Salmonella* sp. dan *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, 2, 87-97.
- Halim, M.R., Tan, M.S., Ismail, S., & Mahmud, R. (2012). Standardization and Phytochemical Studies of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 606-610.
- Harbone, J.B. (1987). *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terbitan Kedua. Terjemahan: Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. ITB: Bandung.
- Harborne, J.B. (1996). *Metode fitokimia*. Terbitan Kedua. Terjemahan Kokasih Padmawinata dan Iwang Soediro. ITB, Bandung.
- Hart, H., L.E. Craine, & D.J. (2003). *Hart. Kimia Organik*. Jakarta: Erlangga. pp, 65-82.
- Heinrich, M. (2009). *Farmakognosi dan fittoterapi*. Jakarta: EGC. pp, 90-101
- Hidayah, N., Windani, I., & Hasanah, U. (2019). Analisis biaya dan produksi simplisia temulawak (*curcumae rhizoma*) di desa semagung kecamatan bagelen kabupaten purworejo. *Jurnal Riset Agribisnis dan Peternakan*, 4(2), 1-10
- Kemendes RI. (2018). *Balai Teknik Kesehatan Lingkungan dan Pengendalian Penyakit (BTKLPP) Kelas I Medan*, No. 15. Medan: Btklpp Medan
- Kemendes RI. (2021). *Profil Kesehatan Indonesia 2020*. Jakarta: Kemendes.
- Kemendes RI. (2023). *Temulawak Ditetapkan Sebagai Tanaman Obat Unggulan Indonesia*. Jakarta: Kemendes.
- Lendon, K. Mc. & Stenard, B.T. (2023). *Salmonella typhi*. Treasure Island. StatPearls Publishing.
- Levani, Y., & Prastya, A.D. (2020). *Demam Tifoid: Manifestasi Klinis, Pilihan*

- Terapi Dan Pandangan Dalam Islam. *Al-Iqra Medical Journal: Jurnal Berkala Ilmiah Kedokteran*, 3(1), 10-16.
- Marjoni M.R., Afrinaldi, & Novita A.D. (2015). Kandungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.). *Jurnal Kedokteran YARSI* 23, 187-196.
- Martinez, F.A.C., Eduardo, M.B., Attilio, C., Paul, D.C., & Ricardo, P.S.O. (2013). Bacteriocin Production by *Bifidobacterium* spp. A Review. *Biotechnology Advances*, 31, 482-488.
- Masyithah, N.Z., Herman & Rijai, L. (2015). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.). *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1(1), 21-28.
- Meteab, B.K. & Abed, A.A. (2018). Isolation and identification of *Salmonella* serotypes in poultry. *Al-Sadisyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 16(3), 75-80.
- Meutia, Y. R. (2011). Bakteriosin: Pengawet Alami Asal Bakteri Asam Laktat. Klasifikasi, Teknik Skrining dan Purifikasi serta Peluang Aplikasinya pada Industri Pangan. *Warta IHP*, 28(1), 38-49.
- National Institute for Communicable Diseases (NICD). (2022). Enteric fever (typhoid and paratyphoid fever): Recommendations for diagnosis, management and public health response. *Enteric Fever Guidelines*, June 2022.
- Orak, H. (2006). Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenol oxidase activities in red grape varieties. *Electronic Journal of Polish Agricultural University Food Science and Technology*, 9, 117-118.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2016). *Antimicrobial Resistance*. Paris, France.
- Prakasita, V.C., Asmara, W., Widyarini, S., Wahyuni, A.E.T.H. (2019). Combinations of herbs and probiotics as an alternative growth promoter: An in vitro study, *Veterinary World*, 12(4), 614-620.
- Putri, I., Jannah, S.N., & Purwantisari, S. (2020). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from *Apis mellifera* and Their Potential as Antibacterial Using in Vitro Test Against Growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *NICHE Journal of Tropical Biology*, 3(1), 26-34.
- Raharti, I., Yuniarti, E., & Handayani, E.W. (2022). Gambaran Peresepan Antibiotik, Biaya, Efektifitas Terapi Pasien Demam Tifoid Rawat Inap RS Palang Biru Kutoarjo: The Image of Prescribing Antibiotics, Cost, Effectiveness of Therapy Thyphod Fever Inpatient at Palang Biru Hospital Kutoarjo. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 4(2), 176-180.
- Rahmat, E., Lee, J., & Kang, Y. (2021). Javanese Turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.): Ethnobotany, Phytochemistry, Biotechnology, and Pharmacological Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021: e9960813.
- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol.* 36, 22-29. doi: 10.1016/j.fm.2013.03.010
- Riley, M. & Chavan, M. (2007). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. 1st ed. Heidelberg: Springer.
- Rukmana, R. (2004). *Temu-temuan Apotik Hidup di Perkarangan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sam, S., Malik, A., Farmasi, F., & Indonesia, U.M. (2020). Penetapan Kadar Fenolik Total Dari Ekstrak Etanol Bunga Rosella Berwarna Merah (*Hibiscus Sabdariffa* L.). 3(2), 182-187.
- Saptari, T. S., Bina, L. & Sayyidah, I.N. (2019). Kadar Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rumpun Laut Coklat (*Padina australis*). *Fitofarmaka*, 9 (1), 1-8.
- Suardana I.W., Ratnawati, B., Sumiarto, & Lukman, D.W. (2008). Deteksi keterkaitan keberadaan coliform, *E. coli*, dengan keberadaan agen zoonosis *E. coli* O157 dan *E. coli* O157:H7 pada feses manusia di Kabupaten Badung Provinsi Bali. *Medicina*. 39(3), 216-218.

- Supomo, Supriningrum, R., & Junaidi, R. (2016). Karakterisasi dan Skrining Fitokimia Daun Kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk.). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 13, 89-96.
- Wahyuni, W., & Karim, S. F. (2020). Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kacapiring (*Gardenia jasminoides* Ellis) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 2(4), 399-404.
- Waterhouse, A. (1999). Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine, Department of Viticulture & Enology University of California. Davis: 152-178.
- Widyawati, P.S., Budianta, T.D.W., Kusuma, F.A., & Wijaya, E.V. (2014). Difference of Solvent Polarity to Phytochemical Content and Antioxidant Activity of *Pluchea Indicia* Less Leaves Extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6 (4), 850-855.
- WHO. (2014). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. Paris: World Health Organization.
- WHO. (2018). *Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. Switzerland: World Health Organization.
- WHO. (2019). *Thypoid*. Switzerland: World Health Organization.
- Zam, W. (2018). Gut Microbiota as a Prospective Therapeutic Target for Curcumin: A Review of Mutual Influence. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2018, 1-11.