

PERBANDINGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL 70% DAN 96% DAUN KUMIS KUCING TERHADAP BAKTERI *ESCHERICHIA COLI*

Estevania Aulia Azza¹, Ira Purbosari^{2*}, Asri Wido Mukti³

Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas PGRI Adi Buana Surabaya^{1,2,3}

*Corresponding Author : ira_purbosari@unipasby.ac.id

ABSTRAK

Penyakit infeksi saluran kemih umumnya banyak disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*. Salah satu bahan alami yang dapat dikembangkan sebagai alternatif antibakteri yaitu daun kumis kucing. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) yang paling optimal pada perbandingan pelarut etanol 70% dan 96% dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dan untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol daun kumis kucing dengan perbandingan pelarut ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada infeksi saluran kemih. Dilakukan penelitian eksperimental menggunakan metode uji difusi sumuran. Diperoleh hasil dan kesimpulan terdapat konsentrasi ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) yang paling optimal pada perbandingan pelarut etanol 70% dan 96% terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* diperoleh pada hasil konsentrasi 100% ekstrak etanol 70% daun kumis kucing sebesar (12,73 ± 0,42 mm) dengan kategori daya hambat kuat sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa antibakteri yang bersifat polar banyak tertarik pada ekstrak etanol 70% daun kumis kucing dikarenakan memiliki tingkat polaritas yang lebih tinggi daripada ekstrak etanol 96% daun kumis kucing dan pada perbandingan pelarut dan konsentrasi ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing dapat mempengaruhi perbedaan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*. Ditunjukkan pada nilai *P-value* <0,05 sehingga terdapat perbedaan signifikan aktivitas antibakteri pada perbandingan ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Kata kunci : aktivitas antibakteri, daun kumis kucing, difusi sumuran, ekstrak etanol, *escherichia coli*

ABSTRACT

Urinary tract infections are generally caused by *Escherichia coli* bacteria. One of the natural ingredients that can be developed as an antibacterial alternative is cat whisker leaves. The purpose of this study was to determine the most optimal concentration of ethanol extract of cat whisker leaves (*Orthosiphon aristatus*) in the ratio of 70% and 96% ethanol solvents in inhibiting *Escherichia coli* bacteria and to determine the inhibition of ethanol extract of cat whisker leaves with a solvent ratio of 70% and 96% ethanol extract of cat whisker leaves (*Orthosiphon aristatus*) against the growth of *Escherichia coli* bacteria in urinary tract infections. Experimental research was conducted using the well diffusion test method. The results and conclusions were obtained that the most optimal concentration of ethanol extract of cat whisker leaves (*Orthosiphon aristatus*) in the comparison of 70% and 96% ethanol solvents against the growth of *Escherichia coli* bacteria was obtained in the results of 100% concentration of 70% ethanol extract of cat whisker leaves amounting to (12,73±0,42 mm) with a strong inhibition category so that it can be concluded that polar antibacterial compounds are attracted to 70% ethanol extract of cat whisker leaves because it has a higher polarity level than 96% ethanol extract of cat whisker leaves and in the comparison of solvents and concentrations of 70% and 96% ethanol extracts of cat whisker leaves can affect differences in antibacterial activity against *Escherichia coli* bacteria.

Keywords : antibacterial activity, cat's whisker leaves, well diffusion, ethanol extract, *escherichia coli*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia yang memerlukan perhatian serius. Salah satu penyakit infeksi adalah infeksi saluran kemih. Sebagai urutan kedua, infeksi saluran kemih merupakan yang sering mengganggu kesehatan perempuan di Indonesia sejumlah 8,3 juta kasus pertahun (Irawan, 2018) dan sekitar 4,2 juta kasus terjadi pada laki-laki (Maulani & Siagian, 2022). Prevalensi ISK pada usia < 40 tahun sebesar 3,2% sedangkan usia 65 tahun keatas memiliki prevalensi 20% (Mokos dkk., 2023). Angka kejadian ISK pada perempuan memiliki nilai sebesar 60% dan laki-laki 40% (Arivo & Dwiningtyas, 2017). Penyebab tersering infeksi saluran kemih adalah bakteri gram negatif yang berasal dari uretra akan naik ke kandung kemih, antara lain *Escherichia coli*, *Proteus sp*, *Klebsiella* (Purnomo, 2014).

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri gram negatif yang sering ditemukan pada pasien infeksi saluran kemih dengan presentase yang paling tinggi yaitu sebesar 48,44% (Imaniah, 2015). Peneliti Carolina, 2017 menyatakan bahwa bakteri *Escherichia coli* mengalami resistensi terhadap beberapa antibakteri seperti ampisilin, kotrimoksazol dan ciprofloxacin, seftriakson dan sefotaksim, gentamisin, kloramfenikol. Mengingat adanya resistensi antibakteri penyebab infeksi saluran kemih terhadap beberapa antibakteri (Carolina, 2017) maka salah satu peluang yang dapat dimanfaatkan untuk menunjang antibakteri terhadap resistensi antibakteri adalah dengan menggunakan bahan alami sebagai alternatif antibakteri.

Bahan alami yang dapat digunakan adalah daun kumis kucing. Berbagai penelitian sudah dilakukan dan menunjukkan bahwa daun kumis kucing mengandung senyawa kimia yang mempunyai daya hambat aktivitas antibakteri seperti flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid (Pelu dkk, 2022). Perlu dilakukan ekstraksi untuk mengambil senyawa tanaman tersebut menggunakan suatu pelarut yang sesuai. Macam-macam pelarut untuk proses ekstraksi tanaman obat dapat menggunakan pelarut seperti pelarut nonpolar (n-heksana), pelarut semi polar (etil asetat), dan pelarut polar (metanol atau etanol) (Hidayah dkk., 2016). Etanol merupakan pelarut yang aman apabila dikonsumsi karena tingkat toksisitasnya yang rendah dibandingkan dengan pelarut lainnya. Menurut penelitian sebelumnya terdapat aktivitas antibakteri dalam ekstrak etanol 70% daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ditunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan semakin besar diameter daya hambat yang dihasilkan (Sri Laras M, 2020).

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol daun kumis kucing dengan perbandingan pelarut ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada infeksi saluran kemih dan mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun kumis kucing yang paling optimal pada perbandingan pelarut etanol 70% dan 96% dalam menghambat bakteri *Escherichia coli*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang daun kumis kucing sebagai alternatif antibakteri sehingga membantu upaya pemerintah kepada fasilitas kesehatan untuk meningkatkan dan mengembangkan pemanfaatan bahan alami ekstrak etanol daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) serta dapat memberikan solusi untuk menurunkan prevalensi infeksi saluran kemih akibat bakteri *Escherichia coli*.

METODE

Desain penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan rancangan yang digunakan adalah tiga perlakuan dan tiga kali perulangan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Farmasi, Laboratorium Farmasetika dan Teknologi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas PGRI Adi Buana Surabaya pada bulan Januari-Mei 2024. Populasi sampel pada penelitian ini yaitu semua daun kumis kucing dengan sampel penelitian adalah 250

gram. Analisa data penelitian ini menggunakan ANOVA *Two-Way*.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu autoklaf, gelas ukur, cawan petri, erlenmeyer, batang pengaduk, kertas saring, gelas beaker, *waterbath*, oven, pipet tetes, kaca arloji, corong gelas, tabung reaksi, cork borror, inkubator, jangka sorong, jarum ose, *laminar air flow*, pembakar bunsen, mikropipet, rak tabung reaksi, timbangan analitik, alumunium foil, kapas usap steril, blender, ayakan, wadah kaca tertutup, *vortex mixer*, *rotary evaporator*, kaca objek dan cover, mikroskop, mortir dan stamper, plastik *wrap*.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu simplisia kering daun kumis kucing yang diperoleh dari Daun Mas Media Husada Bekasi, Jawa Barat. Media yang digunakan yaitu *Mueller Hinton Agar* (MHA). Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli*. Tablet ciprofloxacin 500 mg sebagai kontrol positif, etanol 70% dan 96% sebagai pelarut serta kontrol negatif. Larutan H₂SO₄ 1%, larutan BaCl₂ 1%, NaOH, HCL 2N, pereaksi meyer, FeCl₃ 1%, pewarna kristal violet dan safranin, aquadest, larutan NaCl 0,9% steril.

Alur Penelitian Determinasi Sampel

Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemurnian identitas simplisia tanaman yang digunakan benar-benar tanaman yang diinginkan. Simplisia daun kumis kucing pada penelitian ini diperoleh dari Daun Mas Media Husada Bekasi, Jawa Barat. Determinasi daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) dilakukan di Pusat Informasi dan Pengembangan Obat Tradisional Fakultas Farmasi UBAYA.

Pembuatan Ekstrak

Bagian tanaman yang digunakan adalah daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) kering. Simplisia daun kumis kucing dibuat menjadi serbuk dengan cara diblender dan diayak dengan ayakan mesh No.60 karena derajat kehalusan serbuk simplisia untuk pembuatan ekstrak adalah serbuk simplisia halus dengan ukuran serbuk 250 µm. Pembuatan ekstrak penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode maserasi perbandingan (1:10). Serbuk daun kumis kucing ditimbang sebanyak 250 gram dimasukkan ke dalam masing-masing wadah kaca tertutup dan tambahkan pelarut etanol 70% dan 96% sebanyak 2,5 Liter, direndam selama 3x24 jam dengan sesekali di aduk, kemudian dilakukan remaserasi dengan cara mengulangi proses maserasi menggunakan jenis pelarut yang sama dan setengah volume pelarut awal kemudian hasil maserat disaring dengan kertas saring untuk memisahkan filtratnya lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan *waterbath* menggunakan suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental daun kumis kucing kemudian ditimbang untuk mengetahui hasil akhirnya. Setelah proses pembuatan ekstrak dilakukan penetapan kadar air ekstrak dan identifikasi senyawa fitokimia.

Prosedur Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dari kaca yang akan digunakan dicuci bersih dan dikeringkan seperti gelas ukur, cawan petri, erlenmeyer, batang pengaduk, kertas saring, gelas beaker dibungkus dengan alumunium foil kemudian dimasukkan dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi menggunakan pemijaran api bunsen digunakan untuk alat pinset dan jarum ose. Media *Mueller Hinton Agar* disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan Media MHA

Media MHA pada penelitian ini digunakan untuk peremajaan bakteri dan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli*. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menimbang sesuai kebutuhan

yang digunakan untuk penelitian. Penelitian ini menggunakan total keseluruhan media MHA sebanyak 10,64 gram kemudian ditambahkan aquadest dipanaskan di atas api bunsen hingga larut dan homogen. Media MHA disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Tunggu dingin dengan suhu kurang lebih 50°C. Tuang media ke dalam cawan petri steril sekitar 10-20 mL.

Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

Pemeriksaan bakteri dengan mengambil satu ose bakteri *Escherichia coli*. Letakkan di atas kaca objek dan fiksasi pulasan bakteri dilakukan dengan cara melewatkan kaca objek berisi pulasan di atas api untuk melekatkan dan mematikan bakteri. Tambahkan pewarna kristal ungu, cairan iodin. Kemudian bilas dengan alkohol 96% sampai warna ungu tidak luntur, bilas dengan air dan tambahkan pewarna safranin bilas lagi dengan air dan tunggu kering selanjutnya dilakukan pemeriksaan pada mikroskop dengan menggunakan perbesaran 40-100x. Warna yang tampak seperti warna merah muda menandakan bakteri gram negatif yaitu bakteri *Escherichia coli*.

Peremajaan Bakteri Uji

MHA yang telah di sterilisasi dituang ke dalam tabung reaksi dan posisikan miring. Peremajaan bakteri uji dilakukan dengan cara mengambil bakteri *Escherichia coli* biakan murni sebanyak 1 koloni dengan jarum ose lalu di inokulasi pada media agar miring menggunakan metode goresan zig-zag. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Pembuatan Suspensi Bakteri *Escherichia coli*

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara mensterilkan kawat ose sebelum mengambil bakteri. Sebanyak 1 ose bakteri dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 5-10 mL dan dikocok hingga homogen untuk diseragamkan kekeruhan dengan standar Mc Farland 0,5 (Sri Laras M, 2020) dan dilakukan penentuan absorbansi suspensi bakteri *Escherichia coli* sebesar 0,08-0,10 pada Spektrofotometri Uv-Vis menggunakan panjang gelombang 625 nm.

Pembuatan Konsentrasi Uji Ekstrak Etanol 70% dan 96% Daun Kumis Kucing dan Kontrol Sebagai Pembanding

Konsentrasi 50% (0,50 g ekstrak daun kumis kucing ditambah pelarut etanol 70% dan 96% 1 mL), konsentrasi 75% (0,75 g ekstrak daun kumis kucing ditambah pelarut etanol 70% dan 96% 1 mL), konsentrasi 100% (1 g ekstrak daun kumis kucing ditambah pelarut etanol 70% dan 96% 1 mL), kontrol positif pada penelitian ini menggunakan tablet ciprofloxacin 500 mg. Satu tablet digerus dengan mortir kemudian ditimbang sebanyak 65 mg larutkan dalam 50 mL aquadest, aduk hingga homogen di dalam *beaker glass*. Selanjutnya untuk memperoleh larutan ciprofloxacin 5 µg/50 µL, mengambil 1 mL larutan dan tambahkan aquadest 10 mL aduk hingga homogen serta kontrol negatif menggunakan pelarut etanol 70% dan 96%.

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% dan 96% Daun Kumis Kucing dengan Metode Difusi Sumuran

Suspensi *Escherichia coli* yang sudah siap kemudian disebarkan menggunakan kapas usap steril pada media padat *Mueller Hinton Agar Plate* sampai merata ke semua permukaan media. Supaya suspensi bakteri meresap ke dalam media agar tunggu selama 5 sampai 15 menit. Dibuat sumur dengan cork bor dengan diameter 5-7 mm. Ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing dengan konsentrasi masing-masing 50%, 75%, 100% diteteskan ke dalam lubang sumuran, dan kontrol positif ciprofloxacin 5 µg/50 µL, serta sebagai kontrol negatif berupa

pelarut etanol 70% dan 96%. Selanjutnya di inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Daya hambat berupa daerah bening kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm) secara horizontal dan vertikal.

HASIL

Determinasi Sampel

Simplisia daun kumis kucing kering di determinasi dan dilakukan di PIPOT Fakultas Farmasi UBAYA. Hasil determinasi penelitian ini menyatakan bahwa simplisia kering benar merupakan tanamandaun kumis kucing dengan spesies *Orthosiphon aristatus* (BL.) Miq. Diperoleh hasil identifikasi organoleptis simplisia daun kumis kucing yaitu warna hijau kecokelatan, berbau khas daun kumis kucing, rasa agak pahit.

Pembuatan Ekstrak

Serbuk simplisia sebanyak 250gram dibuat ekstraksi menggunakan metode maserasi, serbuk kemudian diekstrak menggunakan dua pelarut yaitu etanol 70% dan 96%. Filtrat yang didapatkan dari hasil penyaringan proses maserasi dan remaserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* hingga menjadi ekstrak kental. Hasil simplisia serbuk daun kumis kucing 250 gram dilakukan ekstraksi maserasi menghasilkan ekstrak kental etanol 70% daun kumis kucing sebanyak 23,781g dengan presentase rendemen 9,51%. Pada hasil penelitian Pelu dkk, 2022 menggunakan serbuk daun kumis kucing 700g dengan metode ekstraksi maserasi direndam dengan satu liter pelarut etanol 70% selama 3x24 jam memperoleh nilai rendemen ekstrak daun kumis kucing sebesar 7,20%. Hasil rendemen ekstrak etanol 70% daun kumis kucing pada penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Pelu dkk, 2022 disebabkan oleh perbedaan jumlah simplisia dan pelarut yang digunakan sehingga mempengaruhi hasil presentase rendemen.

Untuk ekstrak etanol 96% memperoleh ekstrak sebanyak 14,541g dengan presentase rendemen sebesar 5,82%. Pada penelitian Noor Madani, 2021 proses ekstraksi maserasi menggunakan 100gram serbuk daun kumis kucing dengan pelarut etanol 96% yang direndam selama 3x24 jam memperoleh hasil rendemen sebesar 5,36%. Selanjutnya penelitian ini dilanjutkan penetapan kadar air ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing memperoleh hasil sebesar $0,94\% \pm 0,06$ dan $0,61\% \pm 0,03$ serta identifikasi fitokimia dilakukan pada keempat uji kandungan senyawa antibakteri menunjukkan hasil positif terdapat kandungan senyawa flavonoid, tanin, saponin dan alkaloid dapat dilihat adanya reaksi terbentuknya warna, busa maupun endapan pada ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing.

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% dan 96% Daun Kumis Kucing dengan Metode Difusi Sumuran

Langkah awal dilakukan pada penelitian ini yaitu peremajaan bakteri. Hasil peremajaan bakteri *Escherichia coli* pada media agar miring *mueller hinton agar* menunjukkan adanya pertumbuhan bakteripada goresan *zig-zag* pada area yang telah digores dengan biakan murni, berwarna putih kekuningan. Bakteri *Escherichia coli* yang akan digunakan untuk uji dipastikan kebenarannya dengan cara pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan menunjukkan bakteri bersifat Gram negatif ditandai dengan warna merah muda, berbentuk batang pendek dengan bentuk koloni bulat. Kemudian membuat suspensi bakteri dengan hasil suspensi bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh saat diseragamkan sesuai dengan standar larutan Mc Farland 0,5 dan absorbansi suspensi bakteri *Escherichia coli* memperoleh absorbansi 0,08-0,10. Suspensi bakteri diinokulasi dengan cara goresan *zig-zag* pada permukaan agar menggunakan kapas lidi steril, lalu media agar dibuat lubang sumuran. Pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Arifin &

Sulistiyani, 2023). Uji aktivitas antibakteriekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli* menunjukkan adanya daya hambat berupa zona bening disekitar lubang sumuran.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kumis kucing menunjukkan terbentuk daya hambat pada konsentrasi 50% ($9,42 \pm 0,28$ mm) masuk dalam kategori daya hambat sedang, konsentrasi 75% ($11,18 \pm 0,43$ mm) masuk dalam kategori daya hambat kuat, konsentrasi 100% ($12,73 \pm 0,42$ mm) masuk dalam kategori daya hambat kuat. Penelitian sebelumnya Pelu dkk, 2022 ekstrak etanol 70% daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) menunjukkan aktivitas daya hambat antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi sumuran dan menggunakan tiga konsentrasiberbeda yaitu pada konsentrasi 65% memiliki daya hambat bakteri sebesar 22 mm, konsentrasi 70% memiliki daya hambat bakteri sebesar 25 mm, dan konsentrasi 75% memiliki daya hambat bakteri sebesar 30 mm. hasil penelitian tersebut memiliki persamaan dengan penelitian ini pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kumis kucing ditunjukkan dari konsentrasi ekstrak dan daya hambatnya, semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan daya hambat yang diperoleh semakin besar.

Pada hasil uji penelitian ini aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli* menunjukkan terdapat daya hambat berupa zona bening disekitar lubang sumuranditunjukkan pada konsentrasi 50% terbentuk daya hambat ($5,51 \pm 0,22$ mm) dalam kategori daya hambatsedang, konsentrasi 75% ($9,11 \pm 0,64$ mm) dalam kategori daya hambat sedang, konsentrasi 100% ($9,83 \pm 0,87$ mm) dalam kategori daya hambat sedang. Pada penelitian yang dilakukan Noor Madani, 2021 uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun kumis kucing terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dengan metode difusi cakram menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada pengujian ekstrak tanpa konsentrasi dengan tiga kali replikasi yaitu pada replikasi satu terdapat daya hambat sebesar 7,065 mm, replikasi dua terdapat daya hambat sebesar 8,285 mm dan replikasi tiga terdapat daya hambat 7,03 mm didapatkan rata-rata 7,46 mm. Hasil penelitian ini memiliki rata-rata daya hambat lebih besar dari penelitian yang dilakukan Noor Madani, 2021 dikarenakan perbedaan metode uji yang digunakan. Pada penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran dan pada penelitian yang dilakukan oleh Noor Madani, 2021 menggunakan metode difusi cakram. Metode difusi sumuran memiliki kelebihan pengujian aktivitas antibakteri yaitu konsentrasi ekstrak pada lubang sumuran kontak langsung dengan media yang ditumbuhkan bakteri dan terjadi proses osmolaritas konsentrasi ekstrak lebih menyeluruh, kuat daripada metode difusi cakram dalam menghambat bakteri (Pelu dkk, 2022).

Pada kontrol perbandingan, kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu larutan ciprofloxacin $5\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ yang diperoleh dari tablet ciprofloxacin 500 mg terdapat aktivitas daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan hasil rata-rata sebesar $26,85 \pm 0,26$ mm dalam kategori daya hambat sangat kuat. Mekanisme kerja ciprofloxacin yaitu menghambat kerja DNA *gyrase* selama proses pembelahan sel bakteri (Muslim dkk, 2020) dan bersifat bakterisid. Pada penelitian ini menggunakan kontrol negatif pelarut etanol 70% dan 96% sebanyak $50\mu\text{L}$ diperoleh hasil rata-rata 0 ± 0 mm yang berarti tidak terdapat aktivitas daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hasil kontrol negatif yang diperoleh menandakan bahwa pelarut etanol 70% dan 96% tidak mempengaruhi hasil daya hambat aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*).

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) terhadap bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh berupa data diameter daya hambat aktivitas antibakteri selanjutnya akan dianalisis ANOVA Two-Way menggunakan IBM SPSS statistics 22 didapatkan hasil analisis data dengan nilai $\text{sig } 0,033 < 0,05$ yang berarti ditunjukkan dengan nilai *P-value* $< 0,05$ maka H_0 ditolak dan jika *P-value* $> 0,05$ maka H_0 diterima.

PEMBAHASAN

Pada pembuatan ekstrak, determinasi adalah sebagai langkah awal untuk penelitian ini dengan tujuan mengetahui kebenaran identitas suatu tanaman yang akan digunakan supaya tidak terjadi kesalahan penggunaan sampel. Klasifikasi lengkap tanaman kumis kucing sesuai pada dokumen determinasi penelitian ini dengan nomor surat 1563/D.T/I/2024 adalah sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta Sub Divisi
Angiospermae. Class	: Dicotyledoneae Sub Class
Sympetalae. Ordo	: Tubiflorae
Family	: Lamiaceae
Genus	: <i>Orthosiphon</i>
Species	: <i>Orthosiphon aristatus</i> (BL.) Miq.









Simplisia daun kumis kucing dilakukan pengekstrasian menggunakan metode ekstraksi cara dingin yaitu maserasi. Ekstraksi maserasi adalah sebuah proses ekstraksi dengan perendaman bahan menggunakan pelarut yang sesuai dengan kandungan senyawa antibakteri daun kumis kucing yang akan diambil tanpa proses pemanasan. Bahan tersebut berupa serbuk simplisia daun kumis kucing yang telah diayak menggunakan ayakan mesh no 60. Tujuan pengayakan untuk memperkecil ukuran serbuk simplisia sehingga diperoleh ukuran yang seragam dan memaksimalkan proses ekstraksi maserasi karena semakin kecil ukuran serbuk maka semakin luas permukaan partikelnya sehingga meningkatkan kontak antara pelarut dan serbuk simplisia. Ekstrak kental daun kumis kucing diperoleh dari hasil ekstraksi maserasi serbuk simplisia daun kumis kucing menggunakan dua pelarut yaitu etanol 70% dan 96%. Pelarut etanol mempunyai sifat polar dan universal sehingga senyawa metabolit sekunder yang akan diambil pada daun kumis kucing bersifat polar dan proses ekstraksi menggunakan pelarut polar seperti etanol akan mempermudah mendapatkan banyak senyawa daun kumis kucing yang diinginkan. Senyawa dalam daun kumis kucing sebagai antibakteri bersifat polar sehingga harus dilarutkan dalam pelarut polar dan etanol 70% merupakan pelarut polar yang derajat polaritasnya lebih besar dari etanol 96%.

Proses maserasi dilakukan selama 3x24 jam dengan merendam 250 gram serbuk simplisia menggunakan 2500 ml pelarut etanol 70% dan 96% sebagai cairan penyari dengan perbandingan (1:10) dilakukan sesekali pengadukkan dengan tujuan untuk memastikan semua permukaan serbuk dapat kontak dengan larutan penyari. Ekstraksi maserasi dilakukan remaserasi sebanyak satu kali bertujuan untuk mengoptimalkan penyarian sehingga dapat menarik sisa kandungan senyawa yang masih tertinggal pada proses maserasi awal. Pada proses penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* dan *waterbath* dilakukan pada suhu dibawah titik didih etanol 78°C yaitu dengan menggunakan suhu 50-60°C supaya senyawa yang terkandung pada ekstrak tidak mengalami kerusakan terutama pada senyawa flavonoid yang tidak tahan terhadap suhu diatas 50°C (Hasim dkk, 2016). Selanjutnya dilakukan perhitungan presentase rendemen yang bertujuan untuk mengetahui seberapa banyak ekstrak daun kumis kucing yang diperoleh dari serbuk simplisia daun kumis kucing yang digunakan. Persyaratan rendemen yang baik menurut Farmakope Herbal Indonesia untuk ekstrak kental daun kumis kucing yaitu tidak kurang dari 8,7%. Hasil rendemen ekstrak etanol 70% daun kumis kucing pada penelitian ini dapat dinyatakan memenuhi persyaratan, sedangkan hasil rendemen ekstrak etanol 96% daun kumis kucing tidak memenuhi persyaratan disebabkan oleh faktor proses penguapan pelarut. Pada proses penguapan pelarut ekstrak mengalami banyak penyusutan karena terlalu lama dalam proses penguapan larutan penyari. Proses penguapan larutan penyari dilakukan selama tiga hari, hari pertama dan kedua menggunakan *rotary evaporator* menggunakan kecepatan 70 rpm, suhu 50°C dan hari ketiga menggunakan *waterbath* dengan suhu yang digunakan yaitu

suhu 50°C. Proses penguapan menurut (Fauziyah, 2021) dihentikan apabila pelarut yang sedang diuapkan tidak menetes lagi hingga ekstrak sudah mengental.

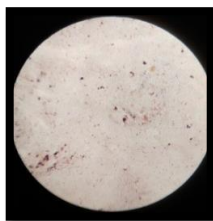
Pada ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing dilakukan identifikasi senyawa fitokimia dilakukan sebagai informasi utama untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak tumbuhan. Uji identifikasi fitokimia yang dilakukan adalah uji kandungan flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid. Hasil uji identifikasi senyawa fitokimia pada ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Identifikasi Senyawa Fitokimia pada Ekstrak Etanol 70% dan 96% Daun Kumis Kucing

Uji	Standar Baku	Hasil		Keterangan
		70%	96%	
Flavonoid	Warna Hijau Kehitaman			Positif
Tanin	Warna Hijau Kehitaman			Positif
Saponin	Busa stabil selama 1-15 menit			Positif
Alkaloid	Endapan merah/putih			Positif

Selanjutnya dilakukan penetapan kadar air dengan metode gravimetri pada penetapan kadar air untuk penelitian ini. Tujuan dari penetapan kadar air pada suatu ekstrak adalah untuk mengetahui kandungan kadar air dalam ekstrak yang mempengaruhi kandungan senyawa selama penyimpanan agar mencegah pertumbuhan mikroorganisme (Husna dkk, 2018). Persyaratan kadar air ekstrak daun kumis kucing tidak lebih dari 10% dan hasil kadar air ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing yang diperoleh pada penelitian ini memenuhi persyaratan yaitu tidak lebih dari 10%.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing, diawali dengan pembuatan peremajaan bakteri. Dilakukan peremajaan bakteri bertujuan supaya bakteri biakan induk tetap dalam keadaan dorman atau bisa aktif kembali menjadi biakan baru dan saat digunakan bakteri dalam keadaan segar sehingga bakteri sensitif saat dilakukan pengujian aktivitas antibakteri (Manalu dkk, 2021). Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri *Escherichia coli* adalah media *mueller hinton agar* (MHA) karena memiliki sumber nutrisi yang baik untuk bakteri dan bersifat netral, mengandung pati gandum berfungsi untuk menyerap racun yang dikeluarkan oleh bakteri *Escherichia coli*. Media peremajaan dibuat agar miring pada tabung reaksi bertujuan mempunyai permukaan media yang lebih lebar daripada permukaan agar tegak juga meminimalisir kontak dengan lingkungan luar dikarenakan ujung lubang tabung reaksi memiliki bentuk tidak lebar dibanding dengan cawan petri. Bakteri *Escherichia coli* yang telah dilakukan peremajaan kemudian dilakukan pembuatan suspensi bakteri dengan larutan NaCl 0,9% steril. Pada bakteri *Escherichia coli* mengukur absorbansi pada panjang gelombang 625 nm hingga diperoleh nilai absorbansi 0,08-0,10 (setara dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5 pada konsentrasi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) (Supriatno, 2018). Kemudian dilakukan pewarnaan Gram bakteri dengan tujuan untuk mengetahui morfologi bakteri *Escherichia coli*. Hasil identifikasi pewarnaan gram bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada gambar 1.

Gambar 1. Hasil Identifikasi Pewarnaan Gram Bakteri *Escherichia coli*

Mekanisme dasar pewarnaan gram adalah dengan mempertahankan warna utama kristal violet sesuai kemampuan dinding sel bakteri, semua kelompok bakteri menyerap pewarna kristal violet tetapi setelah dilarutkan dengan alkohol gram negatif akan kehilangan lapisan lipid sehingga warna kristal violet pudar namun pada gram positif larutan alkohol akan menghidrasi dinding sel gram positif sehingga bakteritetap berwarna kristal violet, lalu pewarnaan safranin untuk memberikan warna pada gram negatif untuk memudahkan identifikasi bakteri (Tripathi & Sapra, 2024). Setelah menemukan identifikasi pewarnaan gram negatif bakteri *Escherichia coli* dilakukan pengujian aktivitas daya hambat ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Pada suspensi bakteri yang telah sesuai dengan absorbansi 0,08-0,10 (setara dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5 pada konsentrasi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/mL), kemudian suspensi bakteri diinokulasi dengan cara goresan *zig-zag* pada permukaan agar menggunakan kapas lidi steril, lalu media agar dibuat lubang sumuran dan memasukkan kontrol positif ciprofloxacin 5µg/50µl dan kontrol negatif pelarut etanol 70% dan 96% sebanyak 50µl, konsentrasi ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) yaitu 50%, 75%, 100% dimasukkan ke lubang sumuran sebanyak 50µl. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli* menunjukkan adanya daya hambat berupa zona bening disekitar lubang sumuran. Hasil aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Daun Kumis Kucing dan Kontrol Pembeding

No	Perlakuan	Replikasi ke –			Rata-Rata ± SD (mm)	Kategori Daya Hambat
		1	2	3		
1.	50%	9,73	9,35	9,18	9,42 ± 0,28	Seïdang
2.	75%	11,60	11,20	10,75	11,18 ± 0,43	Kuat
3.	100%	13,10	12,80	12,28	12,73 ± 0,42	Kuat
4.	Ciprofloxacin (+)	27,00	26,55	27,00	26,85 ± 0,26	Sangat Kuat
5.	Pelarut etanol 70% (-)	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00	Tidak Ada

Penelitian ini juga menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli* dan menunjukkan adanya hasil daya hambat berupa zona bening disekitar lubang sumuran. Hasil aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada tabel 3.

Kontrol positif digunakan sebagai pembeding untuk menentukan tingkat sensitivitas dari zat uji dalam penelitian ini yaitu ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing. Sedangkan kontrol negatif berguna untuk melihat pelarut yang digunakan dalam ekstrak memiliki

pengaruh atau tidak dalam daya hambat yang terbentuk pada setiap konsentrasi ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing. Penyebab dari tidak terbentuknya daya hambat pada kontrol negatif pelarut etanol 70% dan 96% ini disebabkan penggunaan volume yang sedikit sebanyak 50 μ L yang diteteskan ke dalam lubang sumuran. Beberapa penelitian tentang antibakteri yang menggunakan etanol 70% dan 96% sebagai kontrol negatif, seperti penelitian yang dilakukan oleh (Kristina dkk, 2023) tentang aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun tulak terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang menggunakan etanol 70% sebagai kontrol negatif dan tentang aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan rebusan sarang semut terhadap bakteri *Escherichia coli* yang menggunakan etanol 96% sebagai kontrol negatif (Roslizawaty dkk, 2013). Berdasarkan kedua penelitian tersebut, memiliki hasil penelitian yang sejalan dengan penelitian ini yaitu pada kontrol negatif pelarut etanol 70% dan 96% tidak terdapat aktivitas antibakteri.

Tabel 3. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Daun Kumis Kucing dan Kontrol Pembeding

No	Perlakuan	Replikasi ke –			Rata-Rata \pm SD (mm)	Kategori Daya Hambat
		1	2	3		
1.	50%	5,70	5,55	5,28	5,51 \pm 0,22	Seidang
2.	75%	9,70	9,20	8,43	9,11 \pm 0,64	Seidang
3.	100%	10,80	9,60	9,10	9,83 \pm 0,87	Seidang
4.	Ciprofloxacin (+)	27,00	26,55	27,00	26,85 \pm 0,26	Sangat Kuat
5.	Pelarut etanol 96% (-)	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,00	Tidak Ada

Berdasarkan kategori daya hambat yang terbentuk maka pada ekstrak etanol 70% daun kumis kucing dengan konsentrasi 100% memiliki daya hambat yang paling baik terhadap bakteri *Escheichia colidengan* nilai rata-rata $12,73 \pm 0,42$ mm dan termasuk dalam kategori daya hambat kuat. Sedangkan, pada konsentrasi 100% ekstrak etanol 96% daun kumis kucing memiliki daya hambat paling baik terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan nilai rata-rata $9,83 \pm 0,87$ mm dan termasuk dalam kategori daya hambatsedang. Menurut (Pelu dkk, 2022) ekstrak etanol 70% daun kumis kucing (*Orthosiphon aristatus*) bersifat lebih polar daripada etanol 96% sehingga menghasilkan ekstrak lebih banyak dan mengandung banyak senyawa yang bersifat polar sebagai antibakteri. Sesuai dengan penelitian ini bahwa presentase rendemen ekstrak etanol 96% daun kumis kucing yang tidak memenuhi persyaratan menghasilkan hasil ekstrak yang lebih sedikit dan memiliki kategori daya hambat sedang meskipun dalam konsentrasi tinggi yaitu pada konsentrasi sebesar 100%. Salah satu faktor besar kecilnya kemampuan senyawa dalam menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri adalah konsentrasi dari suatu ekstrak yang memiliki suatu senyawa antibakteri (Utomo dkk, 2018). Dalam pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun kumis kucing terhadap bakteri *Escherichia coli* menunjukkan semakin tinggi konsentrasi terdapat peningkatan diameter daya hambat dan memiliki kategori daya hambat berbeda, namun pada ekstrak etanol 96% semakin tinggi konsentrasi terdapat peningkatan diameter daya hambat dan memiliki kategori daya hambat yang sama.

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan dalam penelitian ini bahwa terdapat perbedaan aktivitas antibakteri pada perbandingan ekstrak etanol 70% dan 96% daun kumis kucing serta konsentrasi 100%

optimal pada ekstrak etanol 70% daun kumis kucing dengan daya hambat kuat dikarenakan senyawa antibakteri bersifat polar sehingga banyak tertarik pada ekstrak etanol 70% daun kumis kucing.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada Universitas PGRI Adi Buana Surabaya khususnya Fakultas Ilmu Kesehatan telah memberikan fasilitas laboratorium dalam penelitian ini. Penelitian ini tidak akan berhasil tanpa dukungan, saran dan bimbingan akademik dalam penyusunan artikel ini. Segala kekurangan artikel ini, penulis mengharapkan kritikan dan saran untuk menjadi perbaikan kedepannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, K. Z., & Sulistyani, N. (2023). *Uji Kandungan Bakteri Escherichia coli Dalam Produk Obat Tradisional Yang Dijual Di Pasar Beringharjo*.
- Arivo, D., & Dwiningtyas, A. W. (2017). Uji Sensitivitas Antibiotik Terhadap Escherichia Coli Penyebab Infeksi Saluran Kemih. *Jurnal Ilmu Kedokteran dan Kesehatan*, 4(4), Article 4. <https://doi.org/10.33024/v4i4.1321>
- Carolina, C. P. (2017). *Uji Resistensi Bakteri Escherichia Coli Yang Telah Diisolasi Dari Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK) Terhadap Beberapa Antibiotika*. Poltekkes Kemenkes Palembang Jurusan Farmasi. <https://repository.poltekkespalembang.ac.id/items/show/385>
- Fauziyah, R. (2021). Uji aktivitas antibakteri terhadap Bakteri Pseudomonas aeruginosa serta uji toksisitas ekstrak daun Kelor (Moringa oleifera) hasil sonikasi dengan variasi preparasi sampel [Undergraduate, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim]. <http://etheses.uin-malang.ac.id/29152/>
- Hasim, H., Falah, S., & Dewi, L. K. (2016). Effect of Boiled Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) on Total Phenolic, Flavonoid and its Antioxidant Activity. *Current Biochemistry*, 3(3), Article 3.
- Hidayah, N., Hisan, A. K., Solikin, A., Irawati, I., & Mustikaningtyas, D. (2016). Uji Efektivitas Ekstrak Sargassum muticum Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas Staphylococcus aureus. *Journal of Creativity Student*, 1(2), Article 2. <https://doi.org/10.15294/jcs.v1i2.7794>
- Husna, R. S. N., Effendi, E. M., & Maheshwari, H. (2018). Efek Samping Ekstrak Etanol 96% Dan 70% Herba Kemangi (Ocimum Americanum L.) Yang Bersifat Estrogenik Terhadap Kadar Asam Urat Pada Tikus Putih. *Ekologia: Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*, 16(2), Article 2.
- Imaniah, B. A. (2015). *Peta Kuman Dan Resistensinya Terhadap Antibiotika Pada Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK) Di RSUD Dr. Moewardi Tahun 2014*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Peta-Kuman-Dan-Resistensinya-Terdhadap-Antibiotika-Imaniah/90962536207ca00760b8d0b7cb383bf66ce40bc3>
- Irawan, E. (2018). *Faktor-Faktor Penyebab Infeksi Saluran Kemih (ISK) (Literature Review)* [Preprint]. INA-Rxiv. <https://doi.org/10.31227/osf.io/yt8nz>
- Kristina, N. P. S., Aryasa, I. W. T., & Apriyanthi, D. P. R. V. (2023). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Tulak (Schefflera elliptica (Blume) Harms) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli: Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Tulak Leaves (Schefflera elliptica (Blume) Harms) Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.31002/jtoi.v16i1.601>

- Manalu, R. T., Febriani, A., & Syamsinar, S. (2021). Isolation and characterization of lactic acid bacteria in fermented sweet corn (*Zea mays* l) as antibacterial. *Bioscience*, 5(2), 141. <https://doi.org/10.24036/0202152113708-0-00>
- Maulani, D., & Siagian, E. (2022). *Volume 4 Nomor 4, November 2022 e-ISSN 2715-6885;p ISSN 27149757 http://jurnal.globalhealthsciencegroup.com/index.php/JPPP*. 4(4).
- Mokos, L. F., Hinga, I. A. T., & Landi, S. (2023). *Hubungan Gaya Hidup terhadap Kasus Penyakit Infeksi Saluran Kemih (ISK) pada Wanita di Puskesmas Oebobo Kota Kupang Tahun 2022*. 2(2).
- Muslim, Z., Novrianti, A., & Irnamera, D. (2020). *Resistance Test Of Bacterial Causes Of Urinary Tract Infection Against Ciprofloxacin And Ceftriaxone Antibiotics*. 11.
- Noor Madani, Fiytary. (2021). *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kumis Kucing (Orthosiphon Stamineus) Terhadap Bakteri Propionibacterium acnes*. <https://repository.unism.ac.id/1998/>
- Pelu, A. D., Umar, C. B. P., & Patimahu, N. F. (2022). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan Menggunakan Metode Difusi. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Dan Kesehatan*, 1(2), Article 2. <https://doi.org/10.55606/klinik.v1i2.1176>
- Purnomo, B. B. (2014). *Dasar-dasar Urologi edisi kedua* (Jakarta). Sagung Seto. http://digilib.aakdelimahusadagresik.ac.id%2Findex.php%3Fp%3Dshow_detail%26id%3D4273
- Roslizawaty -, Ramadani, N. Y., Fakhurrrazi -, & Herrialfian -. (2013). Aktivitas Antibakterial Ekstrak Etanol Dan Rebusan Sarang Semut (*Myrmecodia* sp.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Medika Veterinaria*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.21157/j.med.vet..v7i2.2938>
- Santoso, U., Utari, M., & Marpaung, M. P. (2020). Aktivitas Antibakteri Dan Antijamur Ekstrak Batang Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) Terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu-Ilmu Keperawatan, Analisis Kesehatan Dan Farmasi*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.36465/jkbth.v20i2.611>
- Sri Laras Maulida, L. (2020). *Uji Efektifitas Ekstrak Ethanol Daun Kumis Kucing (Orthosiphon aristatus) Terhadap Bakteri Escherichia coli* [Skripsi, Universitas Perintis Indonesia]. <http://repo.upertis.ac.id/1737/>
- Supriatno, S., & Rini, A. A. (2018). Uji Fitokimia Dan Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Kawista (*Limonia Acidissima* L.) Pada Bakteri *Escherichia coli*. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi*, 236–241.
- Tripathi, N., & Sapra, A. (2024). Gram Staining. Dalam *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Utomo, S. B., Fujiyanti, M., Lestari, W. P., & Mulyani, S. (2018). Antibacterial Activity Test of the C-4-methoxyphenylcalix[4]resorcinarene Compound Modified by Hexadecyltrimethylammonium-Bromide against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteria. *JKPK (Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia)*, 3(3), 201. <https://doi.org/10.20961/jkpk.v3i3.22742>