

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK BUAH *Rivina humilis* L. TERHADAP *Klebsiella pneumoniae* DAN *Escherichia coli*

Mariyam¹, P. Santoso¹, Chairunnisa¹

¹Program Studi Kimia, Jurusan Sains, Institut Teknologi Sumatera,
Jalan Terusan Ryacudu, Lampung Selatan, 35365, Indonesia
E-mail: mariyam@ki.itera.ac.id

Abstract

Rivina humilis L. is herbaceous bushy perennial plant found in shrubs. The fruit extract of *Rivina humilis* L. had experienced antibacterial activity against *K. pneumoniae* and *E. coli* using agar diffusion method. The crude extract of nonpolar fraction (n-hexane) of *Rivina humilis* L. showed negative antibacterial activity against *K. pneumoniae* and *E. coli* whereas the methanolic extract has antibacterial activity with 12 mm of inhibition zone for *K. pneumoniae* and 10 mm for *E. coli* in 1 mg/ml concentration. Determination of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) was conducted with variation of concentration (mg/ml) 1; 0.8; 0.6; 0.2; 0 (methanol 96% as negative control), and chloramphenicol (positive control). The result of MIC determination against *K. pneumoniae* showed that the width and the inhibition zone index in the minimum concentration (0.2 mg/ml) were 7 mm and 1.36 respectively. While against *E. coli*, MIC determination exhibited positive result at 0.6 mg/ml with the width and the inhibition zone index were 8 mm and 1.78 respectively.

Keyword: *Rivina humilis* L., *K. pneumoniae*, *E. coli*, antibacterial

1. Pendahuluan

Tanaman obat merupakan sumber utama obat baru yang dapat dijadikan sebagai alternatif dari obat-obatan sintesis [1]. Dalam beberapa tahun terakhir telah terjadi peningkatan yang signifikan dalam penemuan senyawa antibakteri baru, karena tingginya tingkat infeksi terhadap mikroorganisme resisten antibiotik [2]. Salah satu pendekatan yang digunakan dalam penemuan senyawa aktif pada tanaman adalah skrining sistematis pada mikroorganisme atau tanaman yang telah diyakini sebagai sumber terapeutik yang bermanfaat [3].

Rivina humilis L. merupakan tanaman perdu liar yang termasuk dalam family Phytolaccaceae. Tanaman ini tumbuh secara berkoloni pada berbagai jenis tanah hitam [4]. Buah dari *Rivina humilis* L. atau disebut juga dengan *Pigeon Berry* dilaporkan memiliki kandungan betalain yang cukup tinggi dan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antikanker [5]. Selain itu, bagian-bagian lain dari tanaman tersebut seperti daun, batang, akar, dan kulit dari tanaman *Rivina humilis* L. juga memiliki sifat antibakteri, antioksidan dan antipestisida [6], [7].

K. pneumoniae termasuk dalam family Enterobacteriaceae dan merupakan bakteri gram negatif yang bersifat patogen. Bakteri ini berbentuk basil (batang) dan merupakan bakteri yang non-motil (tidak bergerak). *K. pneumoniae* hidup secara berkoloni, mampu menginfeksi saluran kencing, intra-abdomen, paru-paru dan kulit [8]–[10]. Selain itu, bakteri ini dapat memproduksi enzim ESBL (Extended Spektrum Beta Lactamase) yang berfungsi melumpuhkan kerja berbagai jenis antibiotik [11].

Sama halnya dengan *K. pneumoniae*, *E. coli* juga merupakan bakteri patogen, berbentuk basil (batang). Secara garis besar, *E. coli* dapat dikategorikan berdasarkan serogroup, mekanisme patogenisitas, gejala klinis, atau faktor virulensi [12]. *E. coli* memiliki sifat yang unik karena dapat menginfeksi primer pada usus menyebabkan diare, peritonitis, infeksi saluran kemih, meningitis, septikemia (*blood poisoning*) dan pneumonia. Keberadaan bakteri ini dalam air merupakan suatu indikator pencemaran air [13].

Keterlambatan atau ketidaksesuaian pemberian antibiotik telah dikaitkan dengan tingginya angka kematian kepada pasien dengan infeksi berat [14] karena penggunaan antibiotik secara terus menerus kepada pasien dapat mengakibatkan terjadinya *multidrug-resistant* (MDR) [15]. Hal ini sejalan dengan penelitian lain yang menemukan bahwa isolat klinis *K. pneumoniae* dari beberapa klinik kesehatan menunjukkan resistensi terhadap ampicilin, karbenisilin dan colistin [16].

Tanaman herbal memiliki sejarah panjang dalam penggunaannya sebagai obat-obatan, makanan dan aneka kebutuhan sehari-hari. Beberapa studi epidemiologi menunjukkan bahwa peningkatan konsumsi beberapa tanaman obat yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dapat digunakan sebagai bahan untuk treatment pada kerusakan DNA dan karsinogenesis. Selain itu, tanaman herbal juga sering menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis seperti sifat antiinflamatory, anti bakteri, dan anti jamur [17].

Tanaman *Rivina humilis* L. sebagai tanaman obat belum banyak dieksplor manfaatnya di Indonesia. Oleh sebab itu, penelitian mengenai khasiat tanaman *Rivina humilis* L. sebagai tanaman herbal dalam fungsinya sebagai antibakteri terhadap *K. pneumoniae* dan *E. coli* menjadi sangat penting untuk dilakukan.

2. Metode

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu: peralatan gelas (erlenmeyer, gelas kimia, corong, batang pengaduk), timbangan digital, inkubator, autoklaf, rotary evaporator, cawan petri, cawan porselin, ose, mikropipet jangka sorong dan oven. Bahan yang digunakan yaitu: Buah tanaman *Rivina humilis* L., n-heksana (teknis), metanol 96% (teknis), aseton (p.a), akuades, media *Nutrient Agar* (NA), biakan *K.pneumoniae* dan *E. coli* (ATCC 25933) dengan umur bakteri masing-masing 2 minggu pasca peremajaan, kertas Wathman no. 1 dan kertas saring.

2.2 Ekstraksi

Buah *Rivina humilis* L. yang digunakan dalam penelitian diambil di daerah Bandar Lampung. Buah dibersihkan dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 30°C. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan hingga berbentuk serbuk halus. Serbuk kering buah *Rivina humilis* L. (130,599 gram) diekstraksi secara bertingkat menggunakan 2 pelarut yang berbeda polaritasnya, dimulai dengan fraksi n-heksana. Serbuk dimaserasi dengan 500 ml dengan n-heksana selama 24 jam, kemudian disaring dan dikeringkan. Maserasi dilakukan selama 3 kali berturut turut. Filtrat ditampung dan ampasnya dikeringkan di udara terbuka sampai terbebas dari bau n-heksana. Selanjutnya maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 3 kali perulangan. Filtrat diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kasar.

2.3 Uji Aktivitas Antibakteri

Ekstrak n-heksana dan metanol dari buah *Rivina humilis* L. diuji aktivitas antibakterinya terhadap *K. pneumoniae* dan *E. coli* menggunakan uji difusi cakram menurut Kirby-Bauer (1966). Pada masing-masing media yang terpisah, diinokulasikan satu ose bakteri *K. pneumoniae* dan *E. coli* kemudian kertas cakram yang telah mengandung ekstrak *Rivina humilis* L. diletakkan pada media. Aktivitas antibakteri dihitung dengan mengukur zona hambat di sekitar kertas cakram yang terlihat jernih setelah inkubasi pada suhu 27°C selama 18-24 jam. Pengukuran besar zona hambat menggunakan jangka sorong.

Variasi konsentrasi ekstrak buah *Rivina humilis* L. yang digunakan pada penentuan KHTM (Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum) adalah (mg/ml) 1; 0,8; 0,6; 0,2 dan 0 (kontrol negatif menggunakan metanol). Konsentrasi ekstrak dibuat dengan menambahkan metanol sebagai pelarutnya. Kontrol negatif yang digunakan adalah metanol dan kontrol positif adalah chloramphenicol.

3. Hasil dan Pembahasan

Sebelum dimaserasi, sampel buah *Rivina humilis* L. dihaluskan hingga berbentuk serbuk. Tujuannya adalah agar terjadi kerusakan dinding sel pada sampel dan menyebabkan pelarut lebih mudah menarik senyawa yang terkandung di dalam sel tersebut sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh optimal. Serbuk selanjutnya dilakukan ekstraksi secara maserasi [18].

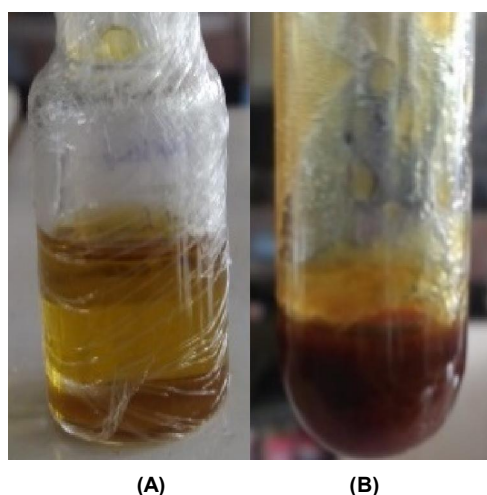
Teknik ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena tidak terjadi pemanasan pada proses ini sehingga senyawa-senyawa metabolit sekunder yang mudah teroksidasi pada suhu tinggi (seperti flavonoid) tidak akan rusak selama ekstraksi. Selain itu, terjadi peristiwa plasmolisis selama maserasi yang menyebabkan terjadi pemecahan pada dinding sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan luar sel, sehingga senyawa yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dan

proses ekstraksi senyawa akan sempurna karena lamanya perendaman dapat diatur. Pemilihan pelarut yang tepat untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksana sebagai fraksi nonpolar dan metanol sebagai fraksi polar. Masing-masing ekstrak dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga di dapatkan ekstrak kasar yang kental.

Hasil ekstraksi (maserasi) buah *Rivina humilis* L. dengan menggunakan pelarut n-heksana (teknis) diperoleh ekstrak cair berwarna kuning dan ekstraksi dengan methanol (teknis) diperoleh ekstrak cair berwarna kuning lebih pekat. Setelah dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* diperoleh larutan ekstrak berwarna kuning bening untuk fraksi n-heksana dan warna coklat untuk ekstrak methanol. Hasil ekstraksi dengan pelarut n-heksana diperoleh ekstrak kasar sebesar 5,67 gram dan dengan pelarut metanol sebesar 25,7 gram.

Fraksi Ekstrak	Warna	Bentuk	Berat (gram)	% Rendemen (b/b)
N-heksana	Kuning	Cair	5,67	4,34%
Metanol	Coklat	Pasta	25,7	19,68%

Tabel 1. Rendemen hasil ekstraksi buah *Rivina humilis* L.



Gambar 1. Hasil Ekstraksi buah *Rivina humilis* L. Ket. : (A. Fraksi n-heksana, B. Fraksi metanol

3.1 Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak buah *Rivina humilis* L. terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *E. coli*.

Aktivitas antibakteri dihitung dengan mengukur zona hambat di sekitar kertas cakram yang terlihat jernih. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan, terdapat perbedaan zona hambat dari ekstrak n-heksana dan metanol buah *Rivina humilis* L. terhadap pertumbuhan *K. pneumoniae* dan *E. coli*. Aktivitas antibakteri terbesar pada kedua bakteri terdapat pada ekstrak metanol. Besar zona hambat yang dihasilkan dari fraksi metanol pada konsentrasi ekstrak 1 mg/ml, untuk bakteri *K. pneumoniae* dan *E. coli* masih berada dibawah chloramphenicol sebagai kontrol positif. Ekstrak methanol buah *Rivina humilis* L. memiliki potensi antibakteri lebih besar pada *Klebsiella pneumoniae* dibandingkan *E. coli*, yaitu masing-masing sebesar 12 mm dan 10 mm. Sedangkan untuk ekstrak fraksi n-heksana, tidak terlihat adanya aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*, tetapi terlihat adanya zona bening terhadap *E. coli* sebesar 8 mm. Besar zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh konsentrasi dan kecepatan difusi senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak buah *Rivina humilis* L. yang memiliki potensi sebagai antibakteri. Selain itu, faktor lain yang juga mempengaruhi lebar zona hambat adalah waktu inkubasi, umur bakteri, suhu, serta pembuatan simplisia. Sebagaimana yang telah dipaparkan oleh Hadioetomo (1993) bahwa waktu inkubasi, umur dan jumlah sel bakteri dapat mempengaruhi pengujian daya hambat suatu bahan sebagai antibakteri.

3.2 Penentuan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM)

Penentuan KHTM dilakukan dengan menguji sederetan konsentrasi sampel yang dibuat dengan cara pengenceran. Konsentrasi ekstrak metanol buah *Rivina humilis* L. yang digunakan dalam penentuan KHTM adalah (mg/ml) 1; 0,8; 0,6; 0,2 dan 0 (kontrol negatif). Kontrol positif yang digunakan adalah chloramphenicol.

Berdasarkan hasil penelitian (seperti yang disajikan pada grafik 1) menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak metanol buah *Rivina humilis* L. menurun seiring dengan menurunnya konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri, maka aktivitas antibakterinya semakin besar pula. Ekstrak methanol buah *Rivina humilis* L. dengan konsentrasi 0,2 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan *K. pneumoniae* dengan zona hambat sebesar 7 mm. Semakin kecil konsentrasi hambat minimum ekstrak menandakan semakin potensial ekstrak tersebut sebagai antibakteri.

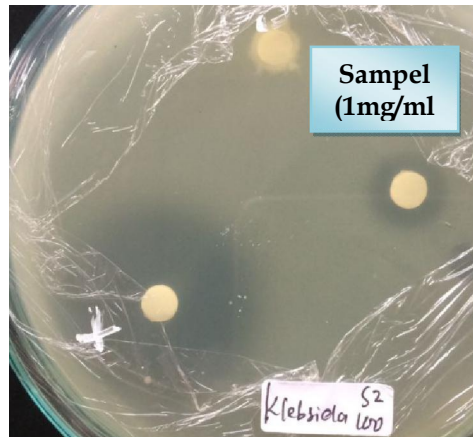
Pada penelitian ini, ekstrak methanol buah *Rivina humilis* L. masih memiliki aktivitas antibakteri pada konsentrasi dibawah 0,2 mg/ml. Kontrol positif (chloramphenicol) 1 mg/ml dapat menghambat bakteri *K. pneumoniae* dengan zona hambat sebesar 25 mm dengan indeks zona bening sebesar 17,36. Penggunaan chloramphenicol sebagai kontrol positif dikarenakan senyawa ini merupakan antibiotik dengan spectrum luas dengan mekanisme kerja yaitu menghambat sintesis protein pada ribosom dari bakteri tersebut. Mekanisme hambat ini bersifat bakteriostatik. Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut metanol dan n-heksana. Hal ini dilakukan untuk membuktikan bahwa pelarut yang digunakan tidak berpengaruh dalam uji antibakteri.

Hasil yang berbeda terhadap bakteri *E. coli*. Sifat antibakteri ekstrak buah *Rivina humilis* L. terdapat pada fraksi n-heksana dan metanol. Pada n-heksana, KHTM terdapat pada konsentrasi 0,8 mg/ml dengan lebar zona bening sebesar 7 mm. Pada metanol, KHTM terdapat pada konsentrasi 0,6 mg/ml dengan lebar zona bening sebesar 8 mm. *K. pneumoniae* dan *E. coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki dinding sel yang tersusun atas lapisan peptidoglikogen. Adanya perbedaan struktur lapisan ini dapat mempengaruhi kerja ekstrak buah *Rivina humilis* L. sebagai senyawa antibakteri sehingga terjadi perbedaan lebar zona hambat pada masing – masing bakteri. Diameter zona hambat dapat menentukan kekuatan daya hambat mikroba suatu bahan/senyawa yang dikelompokkan menjadi 4 bagian yaitu: a) zona hambat ≤ 5 mm tergolong lemah; b) zona hambat 5-10 mm tergolong sedang; c) zona hambat 10-20 mm tergolong kuat; dan d) zona hambat ≥ 20 mm tergolong sangat kuat [19].

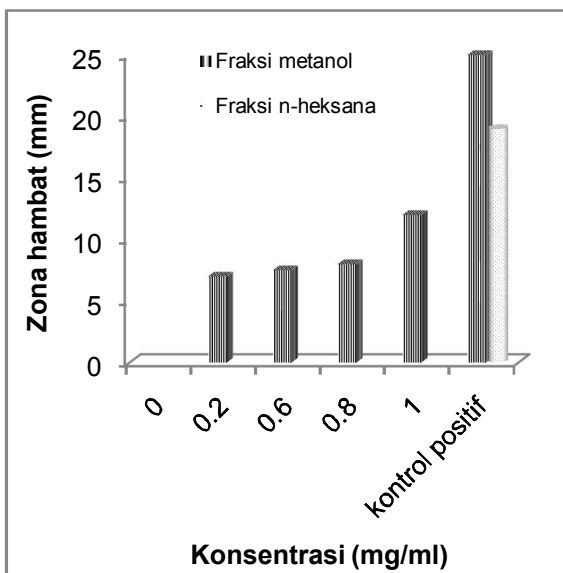
Ekstrak (mg/ml)	Diameter Kertas Cakram (d _b) mm	Diameter Zona Bening (d _z) mm	Indeks Zona Bening (I)	Daya Antibakteri	
<i>K. pneumoniae</i>					
S ₁ (fraksi n-heksana)	(-)	6	-	-	
	0,2	6	-	-	
	0,6	6	-	-	
	0,8	6	-	-	
	1	6	-	-	
	(+)	6	19	10,02	Kuat
S ₂ (fraksi metanol)	(-)	6	-	-	
	0,2	6	7	1,36	Sedang
	0,6	6	7,5	1,56	Sedang
	0,8	6	8	1,78	Sedang
	1	6	12	4	Kuat
	(+)	6	25	17,36	Sangat kuat
<i>E. coli</i>					
S ₁ (fraksi n-heksana)	(-)	6	-	-	
	0,2	6	-	-	
	0,6	6	-	-	
	0,8	6	7	1,36	Sedang
	1	6	8	1,78	Sedang
	(+)	6	14	5,4	Kuat
S ₂ (fraksi metanol)	(-)	6	-	-	
	0,2	6	-	-	
	0,6	6	8	1,78	Sedang
	0,8	6	9	2,25	Sedang
	1	6	10	2,77	Sedang
	(+)	6	26	18,78	Sangat kuat

Tabel 2. Aktivitas antibakteri ekstrak buah *Rivina humilis* L. fraksi n-heksana (S₁) dan fraksi metanol (S₂) terhadap bakteri *K. pneumoniae* dan *E. coli*

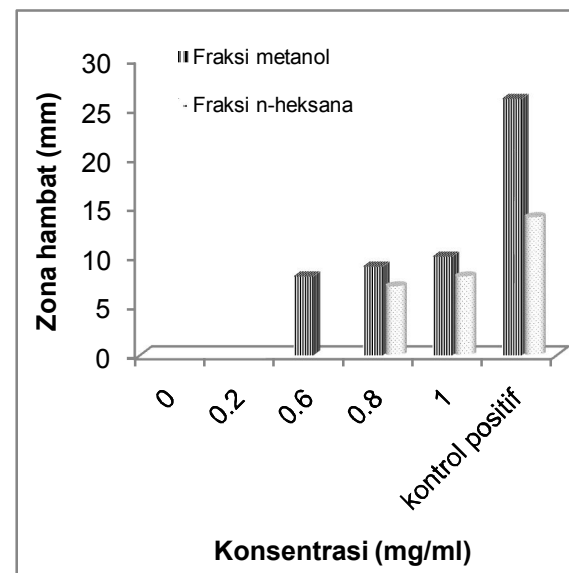
Dari hasil uji KHTM ekstrak buah *Rivina humilis* L. didapatkan bahwa pada *K. pneumoniae*, KHTM ekstrak fraksi metanol berada di konsentrasi kurang dari 0,2 mg/ml dengan diameter zona bening sebesar 7 mm dan indeks zona bening 1,36. Sedangkan pada ekstrak metanol buah *Rivina humilis* L. terhadap *E. coli* berada di konsentrasi 0,2 mg/ml. Pada konsentrasi 0,6 mg/ml dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* sebesar 8 mm dengan indeks zona bening sebesar 1,78. Berdasarkan penelitian ini, ekstrak methanol buah *Rivina humilis* L. memiliki aktivitas antibakteri pada kisaran konsentrasi 0,2-0,6 mg/ml.



Gambar 2. Hasil Uji antibakteri (S₂) *K.pneumoniae* (1 mg/ml)



Grafik 1. KHTM dari ekstrak metanol buah *Rivina humilis* L. terhadap *K. pneumoniae*



Grafik 2. KHTM dari ekstrak metanol buah *Rivina humilis* L. terhadap *Escherichia coli*

Menurut Khan *et. al.*, (2012) bahwa buah *Rivina humilis* L. mengandung pigmen betasianin yang merupakan penyumbang warna merah-violet memiliki fungsi sebagai antioksidan. Sementara itu, buah *Rivina humilis* L. juga mengandung senyawa fenol (-OH). Fenol dengan kadar yang terkandung dalam ekstrak buah *Rivina humilis* L. dapat berinteraksi dengan protein membentuk sebuah kompleks protein-fenol. Ikatan yang terjadi antara protein dengan fenol adalah ikatan yang lemah dan akan segera terurai dalam larutan. Fenol dalam keadaan bebas (tidak terikat dengan kompleks protein), akan berpenetrasi kedalam sel, yang menyebabkan presipitasi dan denaturasi protein. Sedangkan pada kadar yang tinggi, fenol dapat menyebabkan koagulasi protein sehingga akan melisiskan membran sel [20].

Hal ini berkaitan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *E. coli* dimana kedua bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif yang memiliki membran sel. Salah satu penyebab munculnya zona bening adalah adanya senyawa aktif antibakteri pada buah *Rivina humilis* L. yang mampu melisiskan membran sel yang ada pada bakteri tersebut.

4. Kesimpulan

Buah tanaman *Rivina humilis* L. memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri gram negatif yaitu *E. coli* dan *K. pneumoniae*. Ekstrak n-heksana tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *K. pneumoniae* tetapi memiliki hasil yang positif terhadap *E. coli*, terlihat dari adanya zona hambat sebesar 8 mm dengan indeks zona bening 1,78 pada konsentrasi 1 mg/ml. Besar zona hambat ekstrak metanol buah *Rivina humilis* L. terhadap *K. pneumoniae* pada konsentrasi 1 mg/ml adalah sebesar 12 mm dengan indeks zona bening 4, sedangkan pada *E. coli*, lebar zona hambatnya sebesar 10 mm dengan indeks zona bening 2,77. Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM) berada pada kisaran konsentrasi 0 - 0,2 mg/ml terhadap *K. pneumoniae* dan 0,2 - 0,6 mg/ml terhadap *E. coli*. Perlu dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder sebagai uji awal untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam buah *Rivina humilis* L. Selain itu, perlu juga dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan bakteri uji selain *K. pneumoniae* dan *E. coli*.

5. Penghargaan

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Institut Teknologi Sumatera yang telah membiayai penelitian ini melalui skema penelitian Hibah Mandiri tahun 2017, kepada Universitas Lampung atas fasilitas laboratorium dan kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

6. Daftar Pustaka

- [1] B. Tepe, D. Daferera, M. Sökmen, M. Polissiou, and A. Sökmen, "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi* M. Zohary et P.H. Davis," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1132–7, 2004.
- [2] B. P. Marasini *et al.*, "Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–6, 2015.
- [3] Salvat, Antonnacci, Fortunato, Suarez, and Godoy, "Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 32, no. 5, pp. 293–297, 2001.
- [4] C. K. Islands, "The Status of Exotic Plants on the Cocos (Keeling) Islands , Indian Ocean .," no. July, 2002.
- [5] M. I. Khan, P. S. C. Sri Harsha, P. Giridhar, and G. A. Ravishankar, "Pigment identification, nutritional composition, bioactivity, and in vitro cancer cell cytotoxicity of *Rivina humilis* L. berries, potential source of betalains," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 47, no. 2, pp. 315–323, 2012.
- [6] M. Ajaib, "Rivina humilis L : A Potential Antimicrobial and Antioxidant Source," no. October, 2013.
- [7] E. Arumugam, B. Muthusamy, K. Dhamodaran, M. Thangarasu, and K. Kaliyamoorthy, "Pesticidal activity of *Rivina humilis* L. (Phytolaccaceae) against important agricultural polyphagous field pest, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)," *J. Coast. Life Med.*, vol. 3, no. 5, pp. 389–394, 2015.
- [8] J. D. D. Pitout, P. Nordmann, and L. Poirel, "Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, no. 10, pp. 5873–5884, 2015.
- [9] B. Melot, J. Colot, and G. Guerrier, "Bacteremic community-acquired infections due to *Klebsiella pneumoniae*: Clinical and microbiological presentation in New Caledonia, 2008-2013," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 41, no. June 2016, pp. 29–31, 2015.
- [10] C. A. Broberg, M. Palacios, and V. L. Miller, "Klebsiella: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter," *F1000Prime Rep.*, vol. 6, no. August, 2014.
- [11] J. D. Pitout and K. B. Laupland, "Extended-spectrum ??-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 8, no. 3, pp. 159–166, 2008.
- [12] J. P. Nataro and J. B. Kaper, "Diarrheagenic *Escherichia coli*," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, no. 1, pp. 142–201, 1998.
- [13] J. Y. Lim, J. Yoon, and C. J. Hovde, "A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157.," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 20, no. 1, pp. 5–14, 2010.
- [14] S. Harbarth, J. Garbino, J. Pugin, J. A. Romand, D. Lew, and D. Pittet, "Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis," *Am. J. Med.*, vol. 115, no. 7, pp. 529–535, 2003.
- [15] I. Martin-Loeches *et al.*, "Resistance patterns and outcomes in intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification of multidrug resistant organi," *J.*

- Infect.*, vol. 70, no. 3, pp. 213–22, 2015.
- [16] T. J. Kidd *et al.*, “A *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance mechanism that subdues host defences and promotes virulence,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 9, no. 4, pp. 430–447, 2017.
- [17] G. K. Rasineni, D. Siddavattam, and A. R. Reddy, “Free radical quenching activity and polyphenols in three species of *Coleus* Free radical quenching activity and polyphenols in three species of *Coleus*,” *J. Med. Plants Res.*, vol. 2, no. 10, pp. 285–291, 2008.
- [18] I. Fitri and D. I. Widiyawati, “EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK HERBA MENIRAN (*Phyllanthus niruri*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Salmonella sp.* dan *Propionibacterium acnes*,” vol. 6, no. 2, 2017.
- [19] Davis, W.W dan T.R. Stout, Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay, *J. Applied Microbiology*, vol.22, no.4, pp. 659-665, 1971.
- [20] F. Juliantina, D. A. Citra, B. Nirwani, T. Nurmasitoh, E. T. Bowo, and Gnhjk, “MANFAAT SIRIH MERAH (*Piper crocatum*) SEBAGAI AGEN ANTI BAKTERIAL TERHADAP BAKTERI GRAM POSITIF DAN GRAM NEGATIF,” *Jkki*, vol. 10, p. 10, 2008.