

Antibacterial Analysis of Andrographolide Against Selected Gram Positive and Negative Bacteria

Muhammad Zaki¹, Syamsul Multazam^{1*}, Fakhrurrozi¹, Muhammad Nawawi¹

¹Fakultas Ilmu Kesehatan, Sains dan Teknologi, Universitas Bima Internasional MFH, Mataram, Indonesia;

Article History

Received : December 02th, 2025

Revised : December 15th, 2025

Accepted : December 21th, 2025

*Corresponding Author: **Syamsul Multazam**, Fakultas Ilmu

Kesehatan, Sains dan Teknologi,
Universitas Bima Internasional
MFH, Mataram, Indonesia

Email:

syamsulmultazam8@gmail.com

Abstract: Andrographolide is an active compound extracted from *Andrographis paniculata*. It is commonly used in traditional medicine to reduce inflammation and fight bacteria. Studies show that andrographolide can stop bacteria from growing by disrupting their DNA and biofilm formation. It can also help regulate the immune system and lower inflammation caused by bacterial infections. Therefore, andrographolide has the potential to be an alternative to synthetic antibiotics, helping to prevent bacterial resistance and reduce side effects from synthetic antibiotic use. This study aims to investigate the potential antibacterial activity of andrographolide against *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *K. pneumoniae* (ATCC 70063), and *P. aeruginosa* (ATCC 9027). This study utilized the disc diffusion method to determine the inhibitory effects of andrographolide, as well as Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) assays to evaluate its bactericidal properties. Disc diffusion test (3.0 mg/mL) found that andrographolide can inhibit *P. aeruginosa* (23.70 mm), *S. aureus* (16.37 mm), *S. epidermidis* (19.77 mm), and *K. pneumoniae* (14.63 mm). The bacteria *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *K. pneumoniae* have the same MIC and MBC values (1.5 mg/mL), while *P. aeruginosa* has a different value (0.75 mg/mL). These results indicate the bactericidal category at this concentration. Future research should explore how andrographolide works against various strains of bacteria and also investigate how andrographolide affects biofilms.

Keywords: Andrographolide, disc diffusion, MIC, MBC.

Pendahuluan

Tumbuhan telah lama dimanfaatkan sebagai sumber obat oleh manusia karena kandungan metabolit sekunder seperti asam fenolik, flavonoid, tanin, dan antosianin yang memiliki sifat antioksidan dan antimikroba Niroumand *et al.*, (2015). Penggunaan tanaman herbal sebagai alternatif pengobatan semakin penting mengingat meningkatnya resistensi mikroba terhadap antibiotik konvensional yang menurunkan efektivitas pengobatan penyakit menular Tanwar *et al.*, (2014). Oleh karena itu, eksplorasi bahan alami sebagai solusi antibakteri menjadi sangat relevan dan mendesak untuk mengatasi tantangan resistensi obat. Penelitian ini memfokuskan pada senyawa andrografolida yang ditemukan pada tanaman obat

Andrographis paniculata (hempedu bumi) yang telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri, antijamur, dan antioksidan (Banerjee *et al.*, 2017; Kub *et al.*, 2021).

Penelitian ini menekankan pada efektivitasnya melawan bakteri Gram-positif seperti *Staphylococcus aureus* dan bakteri Gram-negatif termasuk *Klebsiella pneumoniae* yang merupakan patogen oportunistik dengan tingkat resistensi obat yang tinggi (Podschun & Ullmann, 1998; He *et al.*, 2022). Mengingat kerentanan kedua jenis bakteri ini terhadap infeksi yang bersifat serius, andrografolida menunjukkan potensi signifikan sebagai kandidat antibakteri alternatif yang relevan dalam pengembangan terapi antimikroba. Berbagai studi sebelumnya telah menunjukkan aktivitas antimikroba andrografolida terhadap *S. aureus*

dengan konsentrasi hambat minimum 100 µg/mL serta kemampuan antiinflamasi dan hipoglikemiknya (Banerjee *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2016). Namun, penelitian yang membandingkan secara langsung efektivitas andrografolida terhadap strain bakteri Gram-positif dan Gram-negatif multiresisten secara simultan, serta mengelaborasi mekanisme antibakterinya masih terbatas. Penelitian ini bertujuan mengisi kekosongan tersebut dengan pendekatan komprehensif yang dapat memperkuat basis ilmiah penggunaan andrografolida sebagai agen alternatif antibakteri.

Dengan latar belakang tersebut, penelitian ini penting untuk dilakukan guna mengkaji lebih dalam potensi antibakteri andrografolida pada patogen utama yang sering menjadi tantangan klinis pada bidang Kesehatan manusia dan peternakan (He *et al.*, 2022). Tujuan utama penelitian ini adalah mengevaluasi aktivitas antimikroba andrografolida terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif yang berpotensi resisten terhadap obat konvensional, sehingga dapat memberikan dasar ilmiah bagi pengembangan terapi antibiotik alami yang efektif dan aman.

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang dirancang untuk menguji aktivitas antimikroba dari andrografolida secara *in vitro*. Desain eksperimental bertujuan untuk mengukur pengaruh senyawa terhadap pertumbuhan bakteri dengan kontrol dan variabel dalam penentuan Zona Hambat dengan *Disk Diffusion*, uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Bima Internasional MFH (Medika Farma Husada) dari Oktober hingga November 2025.

Isolat dan Variabel Penelitian

Isolat penelitian adalah Standar strain bakteri ATCC dari koleksi laboratorium. Isolat terdiri dari 4 strain (2 Gram-negatif: *P. aeruginosa* ATCC 9027, *K. pneumoniae* ATCC 70063; 2 Gram-positif: *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228) dengan masing-masing 3 kali ulangan (total 12 ulangan per uji). Variabel penelitian meliputi: variabel bebas

(konsentrasi andrografolida: 0-6 mg/mL), variabel terikat (zona hambat, MIC, MBC), dan kontrol (gentamisin, siprofloksasin, DMSO 0,1%).

Alat dan Bahan

Bahan kimi terdiri dari Andrografolida (Sigma-Aldrich), etanol 95% (Merck), Alamar Blue (Thermo-Scientific), antibiotik (gentamisin, siprofloksasin/Oxoid). Media kultur: MHA (Mueller Hinton Agar), MHB (Mueller Hinton Broth), NA (Natrium Agar), NB (Natrium Broth), TSA (Tryptic Soy Agar), TSB (Tryptic Soy Broth), MSA (Manitol Salt Agar), MacConkey (Oxoid). Alat terdiri dari Autoklaf, inkubator 37°C, spektrofotometer, pelat 96-well, cawan Petri, mikropipet.

Prosedur Penelitian

Persiapan media: Semua media dilarutkan sesuai prosedur ilmiah, diautoklaf 121°C/15 menit, dan dituang steril pada 45-50°C. **Kultur murni:** Strain diremajakan kembali dari stok gliserol pada media NA, kemudian dikonfirmasi ulang dengan uji Gram dan uji biokimia, sebelum di uji dibuat larutan yang disesuaikan dengan standar McFarland 0,5 (1×10^8 CFU/mL).

Uji disk diffusion (Hudzicki, 2019): Kultur di swabkan pada media MHA, kemudian di injeksikan sebanyak 20 µL andrografolida (0,1875-3 mg/mL) pada cakram, inkubasi 24 jam/35°C. Zona hambat diukur (mm); ≥ 12 mm sensitif, 10-11 mm intermediat, < 10 mm resisten. **Uji MIC/MBC** (Albeed, 2021; Elshikh *dkk.*, 2016): Pengenceran serial 2x pada MHB 96-well, inkubasi 18-24 jam/37°C, tambah 10 µL Alamar Blue, dengan keterangan (biru = non-viabel, pink = viabel). MIC = konsentrasi terendah dengan indikasi perubahan warna biru; MBC = konfirmasi goresan pada MHA tanpa koloni.

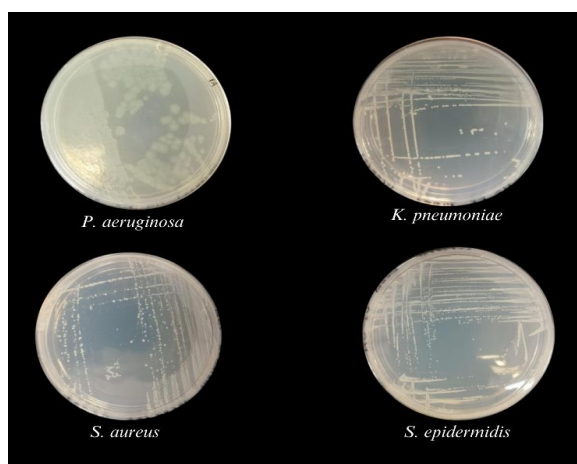
Analisis Data

Data dianalisis dengan ANOVA satu arah menggunakan SPSS 26, disajikan mean $\pm$ SD ($n=3$). Perbedaan signifikan diuji post-hoc Tukey ($p<0,05$). MIC/MBC diinterpretasikan: ≤ 1 mg/mL sangat sensitif, 1-2 mg/mL sensitif, > 2 mg/mL tidak sensitif.

Hasil Dan Pembahasan

Peremajaan Kultur Bakteri dari Stok Gliserol

Bakteri dikultur dari stok gliserol dengan cara digoreskan pada media NA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hal ini dilakukan untuk mengamati dan memastikan keberadaan bakteri. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan pengamatan ini, koloni *S. aureus* muncul dengan warna kekuningan, koloni tersebar di permukaan agar dan tekstur koloni padat atau lebih tebal. karakteristik yang sama yang disebutkan oleh McAdow *et al.*, (2012). koloni *S. aureus* memiliki penampilan warna koloni kuning atau kuning keemasan, mereka dapat terlihat seperti titik-titik kuning yang tersebar di permukaan agar, dan tekstur koloni lebih padat atau lebih tebal daripada beberapa bakteri lainnya. Selanjutnya, pengamatan untuk *S. epidermidis* pada media NA muncul warna putih mengkilap dan koloni berbentuk bulat.



Gambar 1. Pertumbuhan bakteri kultur pada pelat NA

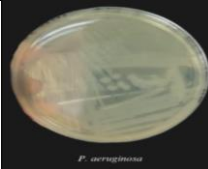
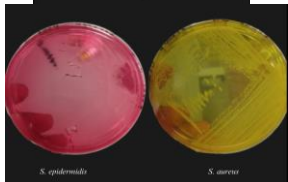
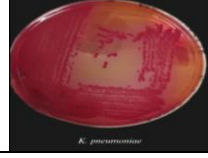
Media NA, koloni *K. pneumoniae* tampak berwarna putih krem dan tekstur koloninya berlendir. Elfidasari, (2013) menyebutkan bahwa koloni *K. pneumoniae* berwarna krem atau putih, bentuk koloninya cenderung besar, dan tekstur koloninya berlendir atau kental. Selanjutnya, pengamatan *P. aeruginosa* pada media NA tampak berwarna putih kehijauan dan bentuk koloninya kasar.

Pertumbuhan *P. aeruginosa* pada TSA, *S. aureus* dan *S. epidermidis* pada MSA dan *K. pneumoniae* pada MacConkey

Bakteri *P. aeruginosa* digoreskan pada media TSA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, sedangkan Bakteri *S. aureus* dan *S. epidermidis* dipindahkan ke dalam MSA untuk konfirmasi lebih lanjut mengenai bakteri ini. Bakteri *S. aureus* dan *S. epidermidis*

diinkubasi setelah 24 jam dan Pertumbuhan *K. pneumoniae* dipindahkan ke media MacConkey untuk konfirmasi lebih lanjut mengenai bakteri tersebut. Bakteri *K. pneumoniae* diinkubasi setelah 24 jam yang dapat diamati pada Tabel 1.

Tabel 1. Pertumbuhan Bakteri Pada Berbagai Media

Gambar Hasil Pertumbuhan Bakteri	Jenis Bakteri dan Media Pertumbuhan
	<i>P. aeruginosa</i> pada TSA
	<i>S. aureus</i> dan <i>S. epidermidis</i> pada MSA
	<i>K. pneumoniae</i> pada MacConkey

Berdasarkan pengamatan pada *P. aeruginosa* yang ditumbuhkan pada media TSA menunjukkan koloni yang kasar dan berlendir, berwarna hijau tua, dan berukuran besar. Aryal (2016) menyatakan bahwa beberapa karakteristik pertumbuhan *P. aeruginosa* pada media TSA adalah sebagai berikut: koloninya besar, permukaannya kasar, dan berlendir. Koloni-koloni ini menyebar luas pada permukaan agar. Warna koloni juga bervariasi, seringkali hijau kebiruan atau hijau tua.

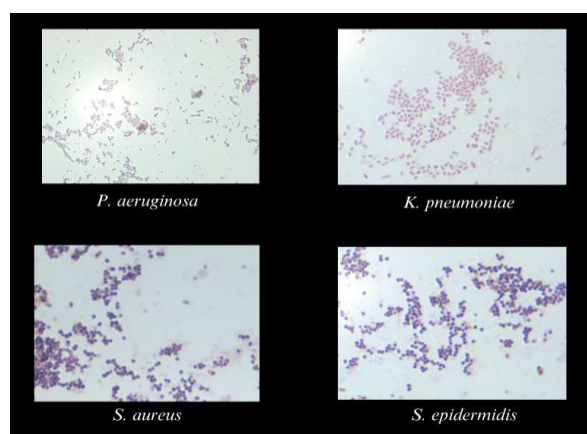
Hasil pengamatan, *S. aureus* tampak dalam koloni warna kuning, sedangkan *S. epidermidis* dalam warna merah, hal ini karena kemampuan bakteri ini untuk membentuk manitol. MSA berfungsi sebagai media pertumbuhan selektif dan diferensial yang secara khusus digunakan untuk menumbuhkan dan membedakan strains *Staphylococcus* (Aryal, 2016). Sifat khusus MSA yang melibatkan peningkatan kadar garam empedu dan manitol, membuatnya selektif dengan menciptakan kondisi yang kurang menguntungkan bagi pertumbuhan banyak jenis bakteri.

Pengamatan, *K. pneumoniae* tampak memiliki warna koloni merah dan berbentuk bulat dan lebar. Bakteri ini juga dapat memfermentasi laktosa sebagai ciri khas untuk membedakan bakteri tersebut. Aryal (2016)

menjelaskan bahwa ketika *K. pneumoniae* ditumbuhkan pada agar MacConkey, pertumbuhannya dapat diidentifikasi melalui karakteristik tertentu dari media ini yang dirancang untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuannya dalam memfermentasi laktosa. Salah satu karakteristik utama pertumbuhan *K. pneumoniae* adalah warna koloni. Koloni yang dihasilkan oleh *K. pneumoniae* pada agar MacConkey umumnya berwarna merah atau merah muda, menunjukkan kemampuannya untuk memfermentasi laktosa dan menghasilkan asam, *K. pneumoniae* termasuk dalam kelompok negatif bakteri yang mampu memecah laktosa menjadi asam yang mengubah indikator pH dalam agar. Bentuk koloni *K. pneumoniae* pada agar MacConkey seringkali berbentuk bulat dan cukup lebar.

Hasil pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan perbedaan antara Gram positif dan Gram negatif. Dalam pewarnaan Gram ini, slide kaca diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2. Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa *S. aureus* dan *S. epidermidis* menunjukkan warna ungu dan membentuk koloni berkelompok seperti anggur atau kokus. Tripathi dan Sapra (2022) menyatakan bahwa *Staphylococcus sp.* sebagai bakteri Gram positif dengan karakteristik morfologi yang khas. Dalam bentuk sel bulat atau kokus, *S. aureus* membentuk kelompok seperti anggur yang disebut stafilokokus.



Gambar 2. Hasil Pewarnaan Gram untuk Semua Bakteri yang Diuji

Warna yang tetap ungu atau biru tua setelah pewarnaan Gram menunjukkan kemampuan dinding sel yang tebal untuk

menahan pewarnaan kristal violet. Sementara itu, hasil pewarnaan Gram pada *K. pneumoniae* dan *P. aeruginosa* tampak berbentuk batang atau basil dan menunjukkan koloni berwarna merah muda. Keduanya merupakan bakteri Gram-negatif, dan menunjukkan ciri morfologi yang menunjukkan ke dalam kategori bakteri Gram negatif. Smith & Hussey, (2005) menyatakan bahwa *K. pneumoniae* tampak berbentuk batang atau basil, dengan sel berwarna merah muda atau ungu setelah pewarnaan, menunjukkan sifat Gram negatif dengan dinding sel tipis. Distribusi sel dapat beragam, dan bakteri ini dapat membentuk gugus atau rantai tergantung pada kondisi pertumbuhan. *P. aeruginosa* juga tampak berbentuk batang, menunjukkan hasil yang serupa dengan penampakan sel berwarna merah muda atau ungu-merah.

Tes biokimia

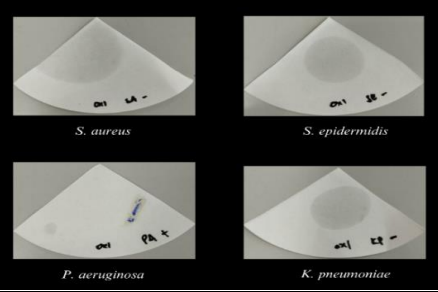
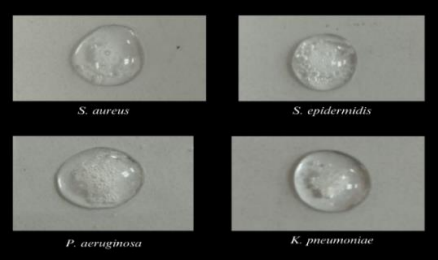
Penelitian ini, uji biokimia dilakukan untuk memastikan identifikasi semua strains bakteri lebih lanjut. Dalam uji biokimia dua uji dilakukan yaitu uji oksidase dan uji katalase. Ringkasan hasil uji biokimia ditunjukkan pada Tabel 2. Uji katalase berguna untuk mengidentifikasi dan membedakan beberapa jenis bakteri. Fungsinya adalah untuk mendeteksi kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase, yang berperan dalam memecah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. *S. aureus* dengan aktivitas katalase positif yang dapat diidentifikasi melalui pelepasan gelembung oksigen ketika hidrogen peroksida ditambahkan. Sementara itu, *S. epidermidis* yang memiliki aktivitas katalase positif menunjukkan reaksi yang serupa (Aryal, 2015). Dalam uji ini, semua bakteri yang diuji menghasilkan katalase positif yang dapat dibuktikan dengan terbentuknya gelembung.

Uji oksidase adalah uji biokimia yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri penghasil enzim oksidase, yang merupakan komponen kunci dalam transmisi elektron selama respirasi aerobik. Proses uji ini melibatkan penempatan tetesan larutan oksidase pada strip kertas indikator yang mengandung senyawa oksidatif seperti tetrametil-p-fenilendiamin diasetat (TMPD). Ketika strip kertas ditempelkan pada koloni bakteri, terjadi reaksi oksidatif yang ditandai dengan perubahan warna menjadi biru atau ungu dalam waktu singkat jika bakteri tersebut menghasilkan oksidase pada bakteri *P. aeruginosa* (Shields & Cathcart, 2010). Hasil positif atau negatif dari uji

oksidase membantu membedakan jenis bakteri Gram negatif, seperti bakteri Enterobacteriaceae, yang umumnya memberikan hasil negatif, dan

bakteri *P. aeruginosa*, yang seringkali memberikan hasil positif (Aryal, 2015).

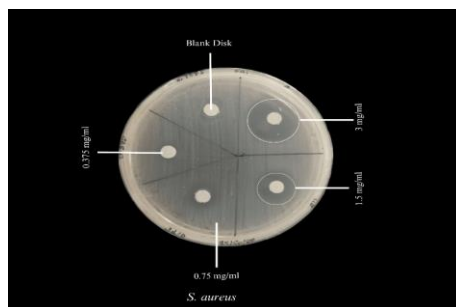
Tabel 2. Ringkasan Hasil Uji Biokimia

Tes Biokimia	Hasil	Pengamatan
Oksidase		Hasil uji oksidase negatif ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna yaitu pada bakteri <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , dan <i>K. pneumoniae</i> . Hasil oksidase positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru yaitu pada <i>P. aeruginosa</i> .
Katalase		Hasil uji katalase positif ditunjukkan dengan terbentuknya gelembung, dimana semua strains menunjukkan hasil yang positif.

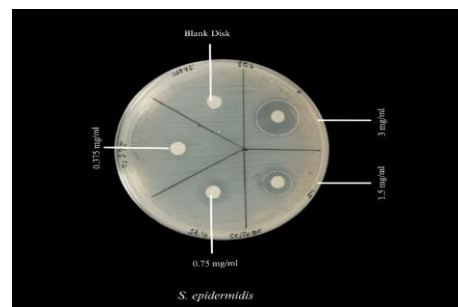
Pengujian Efektivitas Antibakteri Pengujian *Disk Diffusion*

Penelitian ini, zona hambat diukur dalam milimeter menggunakan jangka sorong setelah inkubasi selama 24 jam. Hasil uji difusi cakram

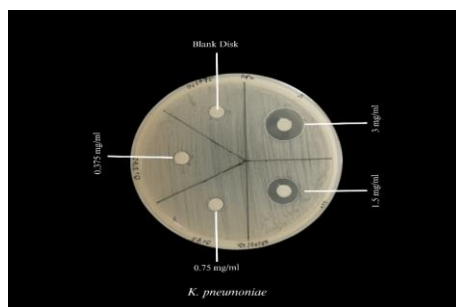
untuk setiap bakteri ditunjukkan pada Gambar 6, 7, 8, dan 9. Sementara itu, interpretasi sensitivitas andrografolid terhadap semua strains bakteri pada uji *Disk diffusion* antibiotik dan kontrol disajikan pada Tabel 3 dan Tabel 4.



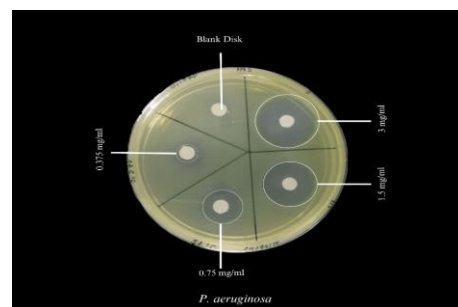
Gambar 6. Zona penghambatan Andrographolide terhadap *S. aureus*



Gambar 7. Zona penghambatan Andrographolide terhadap *S. epidermidis*



Gambar 8. Zona penghambatan Andrographolide terhadap *K. pneumoniae*



Gambar 9. Zona penghambatan Andrographolide terhadap *P. aeruginosa*

Tabel 3. Interpretasi diameter zona *Andrographolide* terhadap semua bakteri yang diuji

Jenis	Rata-rata zona penghambatan Andrographolide terhadap uji strain bakteri (mm)
-------	--

	3 mg/mL	1,5 mg/mL	0,75 mg/mL	0,375 mg/mL	0,1875 mg/mL
<i>Bakteri S. aureus</i> (ATCC 25923)	16,37 ± 0,51 (S)	13,20 ± 0,26 (I)	0,00 ± 0,00 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	0,00 ± 0,00 (R)
<i>S.epidermidis</i> (ATCC 12228)	19,77 ± 0,25 (S)	12,63 ± 0,26 (I)	6,83 ± 0,25 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	0,00 ± 0,00 (R)
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 70663)	14,63 ± 0,35 (S)	12,40 ± 0,40 (I)	7,03 ± 0,15 (R)	0,00 ± 0,00 (R)	0,00 ± 0,00 (R)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	23,70 ± 0,36 (S)	21,07 ± 0,38 (I)	14,47 ± 0,21 (R)	10,53 ± 0,06 (R)	6,67 ± 0,15 (R)

Keterangan: Susceptible (S), Intermediate (I), Resistance (R)

Diameter zona hambat yang teramati meningkat secara signifikan seiring dengan peningkatan konsentrasi andrografolida. Berdasarkan data diameter zona hambat dalam penelitian ini, *P. aeruginosa* memiliki diameter zona hambat terbesar di antara *S. aureus*, *S. epidermidis*, dan *K. pneumoniae*. Andrografolida menunjukkan zona hambat paling besar pada konsentrasi 3 mg/mL, 1,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,375 mg/mL, dan 0,1875 mg/mL terhadap *P. aeruginosa* dengan diameter masing-masing 23,30 mm, 21,07 mm, 14,47 mm, 10,53 mm, dan

6,67 mm. Untuk *S. epidermidis* dengan zona pada konsentrasi 3 mg/mL, 1,5 mg/mL, dan 0,75 mg/mL masing-masing adalah 19,77 mm, 12,63 mm, dan 6,83 mm, menunjukkan hasil yang lebih kecil dibandingkan *K. pneumoniae* sehingga menunjukkan zona inhibisi yang sedikit lebih kecil namun tetap menunjukkan efek signifikan. Sahalan dkk., (2007) mendapatkan hasil yang berbeda *P. aeruginosa* dengan menunjukkan zona inhibisi sebesar 21,50 mm dan 10,50 mm pada konsentrasi masing-masing 50 mg/mL dan 25 mg/mL.

Tabel 4. Cakram kontrol interpretatif diameter zona

Jenis	Rata-rata zona penghambatan kontrol terhadap strain bakteri uji (mm)			
	Disk Kosong	0,1% DMSO	Siprofloksasin	Gentamisin
<i>Bakteri S. aureus</i> (ATCC 25923)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	32,50 ± 0,44 (S)	22,53 ± 0,15 (S)
<i>S.epidermidis</i> (ATCC 12228)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	32,63 ± 0,15 (S)	26,53 ± 0,31 (S)
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 70663)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	21,77 ± 0,21 (S)	15,20 ± 0,26 (S)
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	35,90 ± 0,10 (S)	23,33 ± 0,15 (S)

Keterangan: Susceptible (S), Intermediate (I), Resistance (R)

Berdasarkan Tabel 3. Andrografolida menunjukkan efek antibakteri dengan diameter zona hambat tercatat pada beberapa konsentrasi yang berbeda. Tabel tersebut menunjukkan bahwa zona hambat untuk *S. aureus* pada konsentrasi 3 mg/mL adalah 16,37 mm, dan pada konsentrasi 1,5 mg/mL adalah 13,20 mm. Dalam penelitian yang dilakukan oleh Sule dkk., (2010), zona hambat untuk *S. aureus* pada konsentrasi 1 mg/mL juga sebesar 20 mm. Qamar dkk. (2012), dalam penelitiannya, menghasilkan hasil yang cukup berbeda yaitu pada konsentrasi 1 mg/mL, zona hambat sebesar 19,00 mm untuk *S. aureus*.

Perbedaan kemampuan zona hambat dengan berbagai konsentrasi dari penelitian ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti kepekaan terhadap organisme uji, perbedaan kecepatan difusi dan konsentrasi senyawa

antibakteri. Perbedaan diameter zona hambat yang terbentuk pada masing-masing disk disebabkan oleh tingkat kepekaan organisme uji, perbedaan kecepatan berdifusi suatu senyawa dan konsentrasi senyawa antibakteri (Sarip et al., 2016). Selain faktor-faktor tersebut, perbedaan zona hambat yang terjadi pada masing-masing disk juga dapat disebabkan oleh perbedaan ketebalan media uji.

Pengujian MIC

Pengujian ini menggunakan *microplate 96-well reader* untuk mengecek hasil MIC. *microplate 96-well reader* digunakan untuk melihat hasil MIC dengan spektrofotometer pada gelombang 570 nm. Nilai MIC siprofloksasin dan andrografolida terhadap semua bakteri yang diuji ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 4. Nilai MIC Andrographolide dan Siprofloxacine terhadap semua bakteri yang diuji (mg/mL)

Jenis	Nilai MIC dari semua strain bakteri yang diuji (mg/mL)	
	Andrografolida	Siprofloksasin
Bakteri <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1,5	0,0625
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	1,5	0,0625
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 70663)	1,5	0,0625
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	0,75	0,0625

Tabel 5. Nilai rata-rata MIC Andrographolide terhadap semua bakteri yang diuji dan diamati dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 570 nm

Nilai MIC rata-rata <i>Andrographolide</i> terhadap semua bakteri yang diuji (mg/mL)	Jenis			
	Bakteri <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 70663)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)
3	0,62 ± 0,12	0,68 ± 0,03	0,82 ± 0,19	0,56 ± 0,12
1,5	0,51 ± 0,02	0,59 ± 0,07	0,65 ± 0,08	0,44 ± 0,08
0,75	0,61 ± 0,13	0,71 ± 0,05	0,77 ± 0,02	0,44 ± 0,06
0,375	0,71 ± 0,14	0,73 ± 0,14	0,93 ± 0,03	1,039 ± 0,25
0,1875	1,00 ± 0,03	0,96 ± 0,08	1,00 ± 0,11	0,98 ± 0,17
Air Steril (H2O)	1,07 ± 0,05	1,05 ± 0,02	1,62 ± 0,19	1,02 ± 0,11
0,1% DMSO	1,07 ± 0,07	1,03 ± 0,07	1,57 ± 0,26	1,310 ± 0,08
MHB + C	1,26 ± 0,08	0,95 ± 0,04	0,57 ± 0,24	2,00 ± 0,05
Kosong (MHB)	0,55 ± 0,08	0,60 ± 0,12	0,88 ± 0,14	0,68 ± 0,02

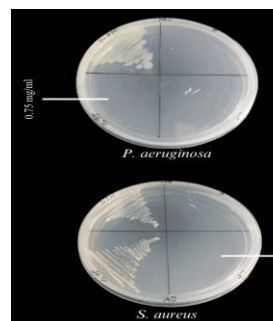
Berdasarkan hasil data tersebut, nilai MIC andrografolid terhadap *S. aureus* adalah 1,5 mg/mL. Demikian pula dengan hasil terhadap *S. epidermidis* yaitu pada 1,5 mg/mL. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Banerjee *et al.*, (2017) melaporkan bahwa nilai MIC untuk *S. aureus* yang diuji dengan ekstrak *A. paniculata* berada pada konsentrasi 1,0 mg/mL. Studi terbaru, hasil untuk *K. pneumoniae* juga menunjukkan nilai MIC sebesar 1,5 mg/mL. Sementara itu, *P. aeruginosa* menunjukkan nilai MIC sebesar 0,75 mg/mL. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Banerjee *et al.*, (2017) menunjukkan bahwa nilai MIC untuk *K. pneumoniae* berada pada 1,0 mg/mL dan *P. aeruginosa* yaitu pada 1,0 mg/mL.

Perbedaan hasil tersebut disebabkan oleh beberapa factor yang menurut Perez-Lopez *et al.*, (2008) menyebutkan bahwa andrografolida cenderung memiliki tingkat sensitivitas yang lebih rendah dalam beberapa uji seperti variasi strains bakteri yang digunakan, evolusi spesies bakteri, dan beberapa faktor spesifik lainnya. Namun hasil penelitian ini menemukan adanya pengaruh perbedaan konsentrasi dibandingkan dengan penelitian lainnya, sehingga nilai MIC terhadap kedua spesies pada penelitian ini memberikan gambaran potensi andrografolida sebagai agen antibakteri.

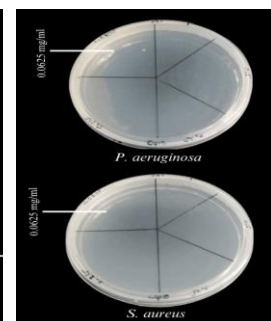
Pengujian MBC

Setelah melakukan uji MIC, dilanjutkan dengan uji MBC. MBC dilakukan dengan

menggoreskan bakteri ke dalam cawan MHA dari mikrotiter MIC 96-well plate, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan nilai MBC. Data ditampilkan pada Gambar 10, Gambar 11, dan Tabel 6.



Gambar 10. Hasil uji MBC *Andrographolide* terhadap semua strain bakteri yang diuji



Gambar 11. Hasil uji MBC Ciprofloxacin terhadap semua strain bakteri yang diuji

Berdasarkan Tabel 6, nilai MBC strain bakteri *S. aureus*, *S. epidermidis*, dan *K. pneumoniae* yang diuji dalam penelitian ini berada pada konsentrasi 1,5 mg/mL, di mana tidak terdapat pertumbuhan strain bakteri uji yang teramati pada konsentrasi tersebut. Banerjee *et al.*, (2017) dalam penelitiannya menunjukkan nilai MBC untuk *S. aureus* berada pada konsentrasi 1,0 mg/mL, yang memiliki konsentrasi lebih rendah daripada nilai MBC yang teramati dalam penelitian ini. Perbedaan ini menunjukkan bahwa efek bakterisida

andrografolid terhadap *S. aureus* dalam penelitian ini berada pada konsentrasi yang lebih tinggi. Sementara itu, *P. aeruginosa* menunjukkan hasil yang paling signifikan dengan menunjukkan nilai MBC yaitu sebesar 0,75 mg/mL. Nilai MBC penting dalam

menentukan efektivitas suatu senyawa terhadap suatu spesies. Nilai-nilai ini mewakili konsentrasi terendah yang dibutuhkan untuk membunuh bakteri, bukan hanya menghambat pertumbuhan bakteri (Rajagopal *et al.*, 2020).

Tabel 6. Rata-rata Nilai MBC Andrographolida dan Siprofloksacin

Jenis	Rata-rata nilai MBC Andrographolide dan Ciprofloxacin	
	Andrografolida	Siprofloksasin
Bakteri <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1.5	0,0625
<i>S.epidermidis</i> (ATCC 12228)	1.5	0,0625
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 70663)	1.5	0,0625
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	0,75	0,0625

Mekanisme Kerja Andrografolida

Mekanisme kerja andrografolida dalam menghambat dan membunuh bakteri melibatkan beberapa cara utama. Pertama, andrografolida dapat mengganggu sintesis peptidoglikan, yaitu komponen utama dinding sel bakteri yang memberikan kekuatan struktural (Guo *et al.*, 2014; Aromdee *et al.*, 2011). Senyawa ini menghambat enzim transglukosilase dan transpeptidase yang berperan dalam pembentukan peptidoglikan, sehingga melemahkan dinding sel dan meningkatkan kerentanan bakteri terhadap lisis (Thammawithan *et al.*, 2022). Kedua, andrografolida merusak membran sel bakteri dengan mengubah permeabilitas dan fluiditas membran. Interaksi andrografolida dengan fosfolipid dan protein membran menyebabkan kebocoran ion, nutrisi, dan metabolit serta hilangnya potensial membran yang esensial untuk fungsi seluler (Zhang *et al.*, 2020). Selain itu, senyawa ini menghambat enzim membran seperti ATPase dan NADH dehidrogenase yang penting dalam produksi energi dan transport elektron (Wang *et al.*, 2022).

Ketiga, andrografolida berperan menghambat proses translasi dan transkripsi dengan mengganggu organel ribosom dan enzim RNA polimerase. Andrografolida berikatan pada ribosom dan RNA polimerase sehingga menurunkan atau menghentikan sintesis protein dan ekspresi gen yang vital bagi pertumbuhan bakteri (Zeng *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2021; Hossain *et al.*, 2021). Ketiga mekanisme ini secara sinergis menyebabkan melemahnya struktur dan fungsi esensial sel bakteri yang berujung pada kematian mikroorganisme, menunjukkan potensi andrografolida sebagai agen antibakteri efektif dan multifungsi.

Kesimpulan

Nilai MIC diperoleh pada konsentrasi 1,5 mg/mL untuk bakteri *S. aureus*, *S. epidermidis*, dan *K. pneumoniae* dalam uji MIC. Sementara itu, nilai MIC untuk *P. aeruginosa* diperoleh pada konsentrasi 0,75 mg/mL. Hasil yang sama diperoleh untuk MBC. Hasil Siprofloksasin sebagai kontrol diperoleh pada konsentrasi 0,1875 mg/mL. Pada uji *disk diffusion*, hasil tertinggi diperoleh *P. aeruginosa*, yaitu pada konsentrasi 3 mg/mL dengan zona hambat 23,70 mm. Sementara itu, pada konsentrasi 3 mg/mL, zona hambat untuk *S. aureus*, *S. epidermidis*, dan *K. pneumoniae* diperoleh masing-masing sebesar 16,37 mg/mL, 19,77 mg/mL, dan 14,63 mg/mL. Oleh karena itu, andrografolida menunjukkan potensi signifikan sebagai alternatif antibiotik alami.

Referensi

- Abdul Mutalib albeed. (2021). *Antioxidant, Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of Ethanolic Seeds Extract of Libyan Peganum Harmala and Cuminum Cyminum*. (June). <https://ir.uitm.edu.my/id/eprint/60077/>
- Ahmad, S., Ariffin, Z., Jusoh, A. Z., Hashim, H., Nazrul, M., Daud, H., & Karuppan, J. (2016). *Penentuan kandungan andrographolide dalam hempedu bumi*. 9, 113–118. <http://ebuletin.mardi.gov.my/buletin/09/Hempedu%20bumi.pdf>
- Aryal, S. (2015, June 24). Catalase Test- Principle, Uses, Procedure, Result Interpretation with Precautions. Microbiology Info.com. <https://microbiologyinfo.com/catalase->

- test-principle-uses-procedure-result-interpretation-with-precautions/
- Aryal, S. (2016, August 31). Mannitol Salt Agar for the isolation of *Staphylococcus aureus*. Retrieved November 15, 2022, from Microbiology Info.com website: <https://microbiologyinfo.com/mannitol-salt-agar-for-the-isolation-of-staphylococcus-aureus/>.
- Banerjee, M., Parai, D., Chattopadhyay, S., & Mukherjee, S. K. (2017). Andrographolide: antibacterial activity against common bacteria of human health concern and possible mechanism of action. *Folia Microbiologica*, 62(3), 237–244. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0496-9>
- Elfidasari, D., Noriko, N., Mira Saraswati, A., Feroza, A., & Canadian Tire, S. F. (2013). Deteksi bakteri *Klebsiella pneumonia* pada beberapa jenis rokok konsumsi masyarakat. *Jurnal Al Azhar Indonesia: Seri Sains dan Teknologi*, 2(1), 41-47. <http://dx.doi.org/10.36722/sst.v2i1.97>
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38(6), 1015–1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>
- He, M., Li, H., Zhang, Z., Jiang, J., Li, H., Yang, W., Cheng, Y., Gao, H., Chen, Q., Du, L., Chen, S., Man, C., & Wang, F. (2022). Microbiological Characteristics and Pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Hainan Black Goat. *Veterinary Sciences*, 9(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090471>
- Hossain, MS, Urbi, Z., Sule, A., & Rahman, KMH (2014). Tinjauan Etnobotani, Fitokimia, dan Farmakologi. *Jurnal Ilmiah Dunia*, 2014, 1–28. <https://doi.org/10.1155/2014/274905>
- Hudzicki, J. (2009). Protokol uji kerentanan difusi cakram Kirby-Bauer. *Perhimpunan Mikrobiologi Amerika*, 15, 55-63. <https://dspace.uc.ac.id/bitstream/handle/123456789/3657/Paper3657.pdf?sequence=4&isAllo#page=181>
- McAdow Molly, Missiakas Dominique M., Schnnewind Olaf (2012) *Staphylococcus aureus* Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections. *Journal of Innate Immunity*, 4, 141-148. <https://doi.org/10.1159/000333447>
- Niroumand, M. C., Farzaei, M. H., & Amin, G. (2015). Review Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: a review. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 35(1), 104–109. [https://doi.org/10.1016/S0254-6272\(15\)30016-9](https://doi.org/10.1016/S0254-6272(15)30016-9)
- Pérez-López, A., Orozco-Hayek, M., Rivas-Galindo, V., & De Torres, N. W. (2008). Experimental design to determine the factors affecting the preparation of extracts for antibacterial use. *Natural Product Communications*, 3(3), 1934578X0800300311. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300311>
- Rajagopal, M., Airody Vasudeva Adhikari, Tzar, M. N., R. Ramliza, & Christophe Wiart. (2020). Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. against bacterial clinical isolates. 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2837-5>
- Sarip, Erismar. A., dan Vivi, F. 2016. Daya Antimikroba Sari Akar Mamba (*Millettia Sericea* W. dan A.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. (STKIP) PGRI Sumatera Barat. <https://jim.upgrisba.ac.id/jurnal/view/05MR>
- Shields, P., & Cathcart, L. (2010). Oxidase test protocol. *American Society for Microbiology*, 1-9. https://asm.org/getattachment/00ce8639-8e76-4acb-8591-0f7b22a347c6/oxidase-test-protocol-3229.pdf?fbclid=IwAR3Y0UGSj7mlg-G20q4ZNqFmNltCvZSrXtauHVRVQ0q69_uMa7B7HIeco43M
- Smith, A. C., & Hussey, M. A. (2005). Gram stain protocols. *American Society for Microbiology*, 1(14), 113-144. <https://egrassbcollege.ac.in/wp-content/uploads/2024/01/gram-stain-protocol-2886-2.pdf>
- Sule, A, Ahmed, Q. U., Samah, O. A., & Omar, M. N. (2010). Screening for Antibacterial Activity of *Andrographis paniculata* Used

- in Malaysian Folkloric Medicine: A Possible Alternative for the Treatment of Skin Infections. <https://opensiuc.lib.siu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1728&context=eb1>
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2014). Multidrug resistance: An emerging crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/541340>
- Thammawithan, S., Talad Thai Song, C., Srichaiyapol, O., Patramanon, R., Hutchison, JA, & Kulchat, S. (2022). Nanopartikel perak terstabilisasi andrografolida mengatasi *Burkholderia pseudomallei* yang resisten terhadap seftazidim: studi aktivitas antimikroba dan cara kerjanya. *Scientific Reports*, 12(1), 10701. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14550-x>
- Tripathi N. & Sapra A. (2022, August 8). Gram Staining. Retrieved November 17, 2022, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32965827/>.
- Tuan Kub, T. N., Aziz, F. M. A., Anis Amiera, M. A., Ahmad, N. N., Salmuna, Z. N., Hassan, S. A., ... & Harun, A. (2021). Antifungal effects and phytochemical screening of *Andrographis paniculata* extracts on dermatomycoses. <http://mjmm.usm.my/uploads/issues/1702/Formatted%20MJM-21-1144-ready-color.pdf>
- Wang, J., Yang, W., Wang, G., Tang, P., & Sai, Y. (2014). Penentuan enam komponen ekstrak *Andrographis paniculata* dan satu metabolit utama andrografolida dalam plasma tikus dengan kromatografi cair – spektrometri massa tandem. *Jurnal Kromatografi B*, 951–952, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.028>
- Zeng, B., Wei, A., Zhou, Q., Yuan, M., Lei, K., Liu, Y., & Ye, Q. (2022). Andrografolid: Tinjauan farmakologi, farmakokinetik, toksisitas, uji klinis, dan penelitian farmasi. *Penelitian Fitoterapi*, 36(1), 336-364. <https://doi.org/10.1002/ptr.7324>
- Zhang, H., Li, S., Si, Y., & Xu, H. (2021). Andrografolida dan turunannya: Pencapaian terkini dan prospek masa depan. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113710. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.720685>
- Zhang, L., Bao, M., Liu, B., Zhao, H., Zhang, Y., Ji, X., & Lu, C. (2020). Efek andrografolida dan analognya terhadap infeksi bakteri: tinjauan. *Farmakologi*, 105(3-4), 123-134. <https://doi.org/10.1159/000503410>