

Uji Anti Bakteri Ekstrak Daun Tanaman Kaki Kuda (*Centella asiatica* L. Urban) sebagai Tumbuhan Obat Anti Tuberkulosis

Aprilia Rimpok,¹ Fona Budiarmo,² Fatimawali²

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

²Bagian Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

Email: 16011101034@student.unsrat.ac.id

Abstract: Tuberculosis is still a serious problem in various countries. Prolonged tuberculosis treatment using several anti-tuberculosis drugs may cause side effects, one of which is multi drug resistance (MDR). Nowadays, people prefer to use herbal plants due to the low price and fewer side effects. One of the herbal plants is tiger herb (*Centella asiatica* L. Urban). This study was aimed to determine the inhibitory and bactericidal activity of the extract of tiger herb leaves on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by using the 7H9 Middlebrook media for the minimum inhibitory concentration (MIC) and Lowenstein Jensen (LJ) media for the minimum bactericidal concentration (MBC). The concentration of tiger herb leaf extract were 12.5%, 25%, 50%, 75%, and 100%. The results showed the MICs were at concentrations of 25%, 75%, and 100%. Meanwhile, the MBC was not found at all concentrations used (25%, 75%, and 100%). In conclusion, *Centella asiatica* L. Urban leaf extract can inhibit but can not kill *Mycobacterium tuberculosis* bacteria.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tiger herb plant, *Centella asiatica* L. Urban

Abstrak: Tuberkulosis masih menjadi permasalahan di berbagai negara. Pengobatan tuberkulosis yang lama dan menggunakan beberapa obat anti tuberkulosis memungkinkan timbulnya efek samping, salah satunya yaitu *multi drug resistant* (MDR). Saat ini masyarakat lebih memilih menggunakan tanaman berkhasiat karena harga yang murah dan memiliki efek samping yang lebih sedikit. Salah satu tanaman yang berkhasiat ialah Tanaman Kaki Kuda (*Centella asiatica* L. Urban). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas daya hambat dan daya bunuh ekstrak daun kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) terhadap pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dengan menggunakan media Middlebrook 7H9 untuk menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan media Lowenstein Jensen (LJ) untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), menggunakan konsentrasi ekstrak daun tanaman kaki kuda: 12,5%, 25%, 50%, 75%, dan 100%. Hasil penelitian menunjukkan KHM pada konsentrasi 25%, 75%, dan 100% namun pada KBM masih terdapat pertumbuhan bakteri di semua konsentrasi yang digunakan yaitu konsentrasi 25%, 75%, dan 100%. Simpulan penelitian ini ialah ekstrak daun tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) dapat menghambat tetapi tidak dapat membunuh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*

Kata kunci: *Mycobacterium tuberculosis*, tanaman kaki kuda, *Centella asiatica* L. Urban

PENDAHULUAN

Mycobacterium tuberculosis termasuk bakteri basil tahan asam (BTA) yang menyebabkan infeksi tuberkulosis (TB).¹ Bakteri ini paling sering menginfeksi organ paru.² Tuberkulosis sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan di berbagai

negara termasuk Indonesia.³ Menurut WHO *Global Report* tahun 2018, kasus baru tuberkulosis sebesar 6,4 juta setara 64% dari 10 juta insiden tuberkulosis secara global. Sebagian besar kasus terbanyak terjadi di wilayah Asia Tenggara (44%).⁴ Indonesia termasuk negara ketiga

dengan beban TB terbesar (8%) setelah India (27%) dan China (9%). Jumlah kasus tuberkulosis di Indonesia sendiri pada tahun 2018 ditemukan sebanyak 566.623 kasus, meningkat dibandingkan dengan tahun 2017 sebesar 446.732 kasus.⁵

Penatalaksanaan tuberkulosis dibagi menjadi 2 tahap pengobatan yaitu tahap awal (intensif) dan tahap lanjutan sehingga pengobatan tuberkulosis relatif lama dan harus teratur. Obat yang digunakan yaitu obat kombinasi dari beberapa obat anti tuberkulosis (OAT). Pengobatan penyakit tuberkulosis dengan obat-obatan modern tersebut memungkinkan timbulnya efek samping akibat ketidakpatuhan pasien mengonsumsi obat, antara lain menyebabkan terjadinya *multi drug resistance* (MDR).⁶

Salah satu tanaman berkhasiat yang telah banyak dimanfaatkan ialah tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban). Tanaman ini merupakan tanaman liar yang banyak dijumpai di kawasan Asia Tenggara salah satunya Indonesia karena beriklim tropis. Daun tanaman kaki kuda dipercayai memiliki fungsi membersihkan darah, melancarkan peredaran darah, diuretika, anti-piretika, meningkatkan saraf memori, anti bakteri, anti inflamasi, hipotensi, insektisida, dan menghambat jaringan bekas luka yang berlebihan.⁷

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium dan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi MIPA Universitas Sam Ratulangi Manado dan di Laboratorium Tuberkulosis Balai Penunjang Pelayanan Kesehatan Provinsi Sulawesi Utara. Populasi yang digunakan ialah tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) sedangkan untuk sampel yaitu daun tanaman kaki kuda diambil dari Desa Watutumou, Kecamatan Kalawat, Kabupaten Minahasa Utara.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini ialah toples kaca, blender, ayakan mesh, timbangan analitik, cawan penguap, cawan Petri, batang pengaduk, pipet tetes, gelas kimia, gelas ukur, tabung Erlenmeyer, corong, pinset, tabung reaksi, spatel,

rak tabung reaksi, jarum ose, *autoclave*, inkubator, oven, *hotplate*, mikropipet, spektrofotometer UV-Vis, *vortex stirrer*, dan kertas saring. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah ekstrak daun tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban), bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, etanol 96%, akuades, NaCl 0,9%, media Lowenstein-Jensen (LJ) Broth, larutan standard Mc. Farland, kertas label, dan aluminium foil.



Gambar 1. Tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) diambil dari Desa Watutumou, Kecamatan Kalawat, Kabupaten Minahasa Utara.

Ekstrak daun tanaman kaki kuda dibuat dengan cara maserasi menggunakan etanol 96%, kemudian dilakukan uji fitokimia secara kualitatif untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak tersebut.⁸ Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antibakteri ini harus disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat gelas disterilkan pada suhu 170°C selama ± 1 jam dalam oven dan untuk bahan media disterilkan pada suhu 121°C selama ± 15 menit dalam *autoclave*.⁹

Konsentrasi ekstrak daun tanaman kaki kuda dibuat dari larutan stok berisi 10 g (100%) ekstrak ditambahkan akuades 5 ml kemudian divorteks hingga larut. Ekstrak diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, 75% dan 100%. Untuk pembuatan stok kultur, diambil satu koloni bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dengan menggunakan kawat ose steril lalu ditanamkan pada media Lowenstein Jensen (LJ) miring dengan cara menggores, setelah

itu diinkubasi selama 14 hari pada 37°C.¹⁰

Untuk pembuatan suspensi bakteri, dari stok kultur *Mycobacterium tuberculosis* yang telah tumbuh diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisi 9,5 ml larutan NaCl 0,9% sampai didapat kekeruhan suspensi bakteri sama dengan kekeruhan larutan standard Mc Farland, berarti konsentrasi suspensi bakteri 10⁸CFU/ml. Kemudian dipipet 0,5 ml suspensi bakteri dan dikocok sampai homogen.

Uji aktivitas anti bakteri dilakukan dua tahap yaitu menilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM). Penentuan KHM dilakukan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dan penentuan KBM menggunakan bantuan alat *Bacteri Coloni Counter*.

HASIL PENELITIAN

Hasil filtrat daun tanaman kaki kuda dari proses maserasi menghasilkan ekstrak etanol yang sangat kental berwarna hijau pekat kehitaman, lengket, dan berat ekstrak yang dihasilkan sebanyak 28,79 gram.

Tabel 1 memperlihatkan hasil skrining fitokimia ekstrak daun tanaman kaki kuda yang dilakukan secara kualitatif untuk menguji kandungan senyawa metabolit sekunder. Didapatkan hasil positif mengan-

dung saponin, steroid, dan fenolik.

Hasil pengujian terhadap aktivitas anti bakteri ekstrak etanol daun tanaman kaki kuda terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan konsentrasi ekstrak yang dipakai yaitu 12,5%, 25%, 50%, 75% dan 100% dan pengulangan sebanyak 3 kali, menunjukkan adanya efek penghambatan bakteri dari ekstrak etanol daun tanaman kaki kuda pada konsentrasi 25%, 75%, dan 100%. Nilai KHM yang diperoleh ialah pada konsentrasi 100%. Untuk uji KBMnya masih didapatkan adanya pertumbuhan koloni sampai konsentrasi 100%.

Tabel 2 memperlihatkan nilai absorbansi sebelum perlakuan inkubasi sedangkan Tabel 3 memperlihatkan nilai absorbansi setelah diinkubasi selama 10 hari. Kemudian ditemukan nilai rerata absorbansi dari setiap konsentrasi, kontrol positif, dan kontrol negatif sebelum perlakuan inkubasi dan sesudah perlakuan inkubasi.

Tabel 4 menunjukkan hasil nilai KHM dari media Middlebrook 7H9 Broth, larutan uji dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, 75%, dan 100%, dan larutan isoniazid terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabel 5 memperlihatkan hasil uji KBM ekstrak etanol daun tanaman kaki kuda pada tiga kali pengulangan.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak daun tanaman kaki kuda secara kualitatif

No	Golongan senyawa	Pereaksi	Hasil uji	Keterangan
1.	Alkaloid	Mayer	Negatif	Tidak terbentuk endapan berwarna putih
		Wagner	Negatif	Tidak terbentuk endapan
		Dragendorff	Positif	Terbentuk endapan berwarna jingga
2	Saponin	Aquades	Positif	Terbentuk buih-buih stabil tapi sedikit
3	Tanin	Etanol FeCl ₃	Negatif	Tidak terbentuk warna hitam kebiruan atau hijau
4	Triterpenoid/Steroid	Asam asetat glasial H ₂ SO ₄	Positif steroid	Terbentuk warna biru
5	Flavonoid	Mg HCl pekat	Negatif	Tidak terbentuk warna merah tua
6	Fenolik	FeCl ₃	Positif	Terbentuk warna hitam

Tabel 2. Nilai absorbansi sebelum perlakuan inkubasi

Konsentrasi bahan uji	Pengulangan		
	I	II	III
Ekstrak 100%	1,699	1,894	1,801
Ekstrak 75%	1,262	1,120	1,055
Ekstrak 50%	0,941	0,871	0,484
Ekstrak 25%	0,393	0,434	0,602
Ekstrak 12,5%	0,241	0,247	0,244
Isoniazid	0,073	0,064	0,063
MB 7H9 Broth	0,054	0,054	0,054

Tabel 3. Nilai absorbansi setelah perlakuan inkubasi

Konsentrasi bahan uji	Pengulangan		
	I	II	III
Ekstrak 100%	1,722	1,956	1,911
Ekstrak 75%	1,524	1,211	1,156
Ekstrak 50%	0,982	1,152	0,905
Ekstrak 25%	0,632	0,661	0,696
Ekstrak 12,5%	0,852	0,855	0,812
Isoniazid	0,096	0,099	0,101
MB 7H9 Broth	0,082	0,091	0,088

Tabel 4. Nilai KHM pada beberapa konsentrasi larutan uji

Konsentrasi bahan uji	Nilai absorbansi		Nilai KHM
	Sebelum inkubasi	Setelah inkubasi	
Ekstrak 100%	1,798	1,863	0,065
Ekstrak 75%	1,146	1,297	0,151
Ekstrak 50%	0,765	1,013	0,248
Ekstrak 25%	0,476	0,663	0,187
Ekstrak 12,5%	0,244	0,839	0,595
Isoniazid	0,066	0,098	0,032
MB 7H9 Broth	0,054	0,087	0,033

Tabel 5. Nilai KBM pada beberapa konsentrasi larutan uji

Konsentrasi bahan uji	Pengulangan		
	I	II	III
Ekstrak 100%	3	7	6
Ekstrak 75%	18	21	23
Ekstrak 25%	TT	TT	TT
MB 7H9 Broth	0	0	0

BAHASAN

Pada penelitian ini dibuat ekstrak daun kaki kuda melalui proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Metode maserasi dipilih karena sederhana, murah, peralatan yang digunakan mudah didapat, dan dapat meminimalisir rusaknya senyawa akibat

panas. Pelarut etanol 96% dipilih karena merupakan pelarut polar. Etanol dapat melarutkan berbagai zat aktif sehingga dapat menghasilkan senyawa metabolit lebih banyak. Alasan lain memilih etanol karena mudah didapat, sifatnya yang netral, dan dapat menghambat kerja enzim.¹¹

Bakteri uji *Mycobacterium tuber-*

culosis yang dipilih yaitu bakteri H37Rv. Bakteri H37Rv merupakan bakteri yang masih sensitif terhadap OAT lini pertama yaitu rifampicin dan isoniazid. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dipilih karena dapat menginfeksi dan menyebabkan penyakit tuberkulosis yang sampai saat ini masih menjadi permasalahan kesehatan berbagai negara.^{3,12}

Dalam penelitian ini dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder dari ekstrak etanol daun tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban). Berdasarkan hasil pengujian ekstrak positif mengandung saponin, steroid, dan fenolik sedangkan kandungan flavonoid dan tanin memberikan hasil negatif. Untuk uji alkaloid dari tiga pereaksi yang digunakan yaitu pereaksi Wagner, pereaksi Mayer, dan pereaksi Dragendorff, hasil positif hanya ditunjukkan pada pereaksi Dragendorff. Hasil uji alkaloid ini berbeda dengan penelitian Salmiwanti¹³ yang juga menggunakan daun *Centella asiatica* L. dan mendapatkan ketiga uji alkaloid memberikan hasil positif.

Hasil positif saponin dikarenakan terbentuknya buih-buih setelah penambahan etanol dan kemudian dikocok. Pada penelitian ini buih-buih yang terbentuk tidak banyak. Penelitian yang dilakukan oleh Lotulung et al¹⁴ menunjukkan hasil positif pada kandungan triterpenoid dan hasil negatif pada kandungan steroid. Hasil tersebut juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan Januwati dan Yusron¹⁵ mengenai uji fitokimia daun pegagan (*Centella asiatica* L.) yang melaporkan terdapatnya kandungan triterpenoid. Hasil kedua penelitian tersebut tidak selaras dengan penelitian ini yang mendapatkan hasil uji kandungan triterpenoid/steroid menunjukkan positif pada steroid dan negatif pada triterpenoid. Hasil positif untuk uji steroid karena terbentuknya warna biru sedangkan untuk positif triterpenoid akan terbentuk merah, jingga, atau ungu. Untuk uji fenolik pada hasil penelitian ini memberikan hasil positif, yang berbeda dengan penelitian Bermawie et al¹⁶ yang tidak menunjukkan adanya fenolik.

Hasil uji flavonoid dan tanin memberikan hasil negatif; hal ini berbeda dengan beberapa pustaka yang mendapatkan hasil positif. Hasil negatif uji flavonoid pada penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Hapsari et al¹⁷ dan Salmiwanti et al.¹³ Uji flavonoid memberikan hasil negatif karena tidak terbentuknya warna merah tua. Dalam penelitian ini, uji flavonoid dilakukan juga pada simplisia dikarenakan hasil negatif dimungkinkan oleh proses ekstraksi. Berdasarkan hasil uji flavonoid menggunakan simplisia didapatkan hasil tetap negatif untuk flavonoid. Hasil uji flavonoid pada penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan Rahmi¹⁸ dan Lotulung et al¹⁴ yang menunjukkan hasil flavonoid positif.

Dalam hal uji tanin untuk hasil positif terjadi perubahan warna menjadi hitam kebiruan atau hijau. Ekstrak etanol daun tanaman kaki kuda juga memberikan hasil warna hijau jika ditambahkan pereaksi pada setiap uji. Hal ini dapat menjadi lebih sukar atau bias untuk menentukan hasil uji tanin.^{13,14,17,18}

Sebagian hasil pengujian fitokimia ekstrak etanol daun tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) pada penelitian ini tidak sesuai dengan beberapa pustaka. Hal ini menunjukkan bahwa faktor-faktor lingkungan seperti iklim, cahaya matahari, kelembaban, dan kesuburan tanah dapat memiliki pengaruh terhadap hasil senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode dilusi cair dan dilusi padat. Metode dilusi cair menggunakan media Middlebrook merupakan media uji anti tuberkulosis yang sering digunakan. Media ini dipilih karena cepat menumbuhkan bakteri. Metode dilusi padat menggunakan media LJ (Lowenstein Jensen) yang berbasis telur. Media ini sering digunakan dalam kultur bakteri sesuai anjuran dari *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUATLD). Media ini lebih sensitif karena mengandung bahan gliserol yang diperlukan untuk

pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dan *malachite green* yang dapat menghambat bakteri lain untuk tumbuh.^{19,20}

Penggunaan media Middlebrook 7H9 Broth sebagai kontrol negatif bertujuan untuk menyingkirkan adanya kemungkinan efek anti bakteri dan untuk perbandingan pertumbuhan koloni. Penggunaan larutan pembanding yaitu isoniazid sebagai kontrol positif untuk pembanding efek antara obat anti bakteri dengan larutan ekstrak uji yaitu ekstrak daun tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban). Selain itu isoniazid merupakan obat lini pertama pada pengobatan TB.

Pengujian yang dilakukan terhadap kontrol positif untuk bakteri *Mycobacterium tuberculosis* memberikan hasil daya hambat yang kuat yang berarti isoniazid masih sensitif. Hasil nilai KHM yang ditunjukkan kontrol positif lebih rendah daripada masing-masing konsentrasi larutan uji.

Pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan menentukan nilai KHM dan KBM menggunakan metode dilusi cair dan ditanam di media padat. Tingkat kekeruhan diamati setelah diinkubasi selama 10 hari pada suhu 37°C. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan untuk mengetahui KHM didapatkan bahwa pada konsentrasi 100%, 75%, dan 25% terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri. Nilai KHM yang diperoleh ialah pada konsentrasi 100% (Tabel 4).

Penelitian yang dilakukan Amilah dan Ajiningrum²¹ tentang uji efektifitas daya hambat pegagan menunjukkan bahwa konsentrasi 20% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* sedangkan penelitian yang dilakukan Salmiwanti¹³ mendapatkan hasil penghambatan bakteri optimal pada konsentrasi 60%, 80%, dan 100%.

Hasil positif adanya daya hambat pada ekstrak etanol daun tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) didasarkan karena mengandung senyawa-senyawa seperti saponin dan steroid yang menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme anti bakteri saponin menyebabkan kebocoran

protein dan enzim di dalam bakteri dan mekanisme antibakteri senyawa steroid mampu berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang menyebabkan membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis.²²

Berdasarkan hasil penelitian, nilai KBM dengan metode dilusi padat menggunakan media Lowenstein-Jensen (LJ) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi ekstrak daun tanaman kaki kuda 100%, 75%, dan 25%. Pada konsentrasi 100% dan konsentrasi 75% menunjukkan masih adanya pertumbuhan koloni walaupun sedikit sedangkan pada konsentrasi 25% menunjukkan adanya pertumbuhan koloni yang banyak sehingga tidak terhitung (TT).

SIMPULAN

Ekstrak etanol daun tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada konsentrasi 100% tetapi tidak dapat membunuh bakteri tersebut.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam studi ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Books GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick & Adelberg (25th ed). Nugroho AW, translator. Jakarta: EGC, 2013
2. Rostinawati T. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol dan ekstrak air kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap *Mycobacterium tuberculosis* gGalur labkes-026 (*Multi Drug Resistant*) dan *Mycobacterium tuberculosis* galur H37Rv secara in vitro [Penelitian Mandiri]. Jatinangor: Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran; 2008.
3. Departemen Kesehatan RI. Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis. Jakarta: Depkes RI, 2007; p. 3-35.
4. World Health Organization. Estimates of TB and MDR-TB burden are produced by

- WHO in consultation with countries. Geneva: WHO, 2013.
5. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Tuberkulosis. 2018 [cited 2019 Aug 18]. Available from: <http://www.depkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/info datin%20tuberkulosis%202018.pdf>
 6. Pameswari P, Halim A, Yustika L. Tingkat kepatuhan penggunaan obat pada pasien tuberculosis di Rumah Sakit Mayjen H.A Thalib Kabupaten Kerinci. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. 2016;2(2):116-21.
 7. Herlina, Hutasoit L. Pengaruh senyawa murni dari pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap fungsi kognitif belajar dan mengingat dan efek toksisitas pada mencit (*Mus Musculus*) betina [Makalah untuk Seminar]. Palembang: Universitas Sriwijaya; 2011.
 8. Sangi M, Runtuwene MRJ, Simbala HEI, Makang VMA. Analisis fitokimia tumbuhan obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry progress*. 2008;1:47-53.
 9. Tatang I, Pratiwi SUT, Kuswandi, Tresnaasih N, Cahya D, Fatmarahmi, Paramitha Y. Aktivitas anti-tuberkulosis ekstrak etil asetat daun kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) dan daun sendok (*Plantago major* L.) secara *in vitro*. *Trad. Med. J*. 2018;23(1):1-8
 10. Lay BW, Hastowo S. Mikrobiologi. Bogor: IPB, 1992.
 11. Voight R. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi (5th ed). Yogyakarta: UGM, 1994; p. 561-8.
 12. Garmana AN, Sukandar EY, Fidrianny I. Uji aktivitas ekstrak beberapa tumbuhan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* galur sensitif dan resisten. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 2011; XXXVI(3& 4):2011-35.
 13. Salmiwanti, Ilyas A, Saleh A. Isolasi senyawa metabolit sekunder fraksi N-heksana dari daun pegagan (*Centella asiatica* L.) dan uji anti bakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* Al-Kimia. 2016; 4(2):52-63.
 14. Lotulung PDN, Handayani S, Ernawati T, Yuliani T, Artanti N, Mozef T. Standardisasi ekstrak pegagan, *Centella asiatica* sebagai obat herbal terstandar hepatoprotektor. *JKTI*. 2015;17(2):185-93.
 15. Januwati M, Yusron M. Standar Operasional: Budidaya pegagan, lidah buaya, sambiloto dan kumis kucing. Circular No. 9. Bogor: Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, 2004.
 16. Bermawie N, Purwiyanti S, Mardiana. Keragaan sifat morfologi, hasil dan mutu plasma nutfah pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.). *Bul Littro*. 2008;XIX(1):1-17.
 17. Hapsari WS, Rohmayanti R, Yuliasuti F, Pradani MPK. Skrining fitokimia ekstrak etanol herba pegagan dan analisa rendemen. Magelang: URECOL, 2017; p. 471-5.
 18. Rahmi VU. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak Etil Asetat Daun Tumbuhan Pegagan (*Centella Asiatica* (Linn) Urban) dan Uji Aktivitas Antibakteri [Diploma tesis]. Padang: Universitas Andalas; 2019.
 19. Ariami P, Diarti MW, Jiwintarum Y. Sensitivitas media Ogawa dan media Lowenstein Jensen terhadap hasil pertumbuhan kuman *Mycobacterium tuberculosis*. *Jurnal Kesehatan Prima*. 2014;8(2):1322-35.
 20. Pratiwi. Mikrobiologi Farmasi. Jakarta: Erlangga, 2008.
 21. Amilah S, Ajiningrum PS. Uji efektifitas daya hambat sari daun pegagan (*Centella asiatica*) dan daun beluntas (*Pluchea indica* Less) terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. *Stigma Journal of science*. 2015;8(2):6-11.
 22. Rijayanti RP. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun mangga bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* [Naskah Publikasi]. Pontianak: Universitas Tanjung Pura; 2014.