

Studi *In Vitro* Kombinasi Temulawak, Madu, dan Probiotik sebagai Kandidat *Growth Promoter*

Combination of Wild ginger, Honey, and Probiotics as Growth Promoter Candidates: An in Vitro Study

Marlin Cindy Claudya Malelak¹, Agnesia Endang Tri Hastuti Wahyuni^{2*}, Agustina Dwi Wijayanti³,
Vinsa Cantya Prakasita⁴

¹Program Studi Sains Veteriner, Sekolah Pascasarjana Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

⁴Departemen Biologi, Fakultas Bioteknologi, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta

*Corresponding author; email: wahyuni_aeth@mail.ugm.ac.id

Diterima: 8 Januari 2020 direvisi: 10 Agustus 2022 disetujui: 24 Oktober 2022

Abstract

Growth Promoter Antibiotics are used to prevent disease and promote growth and production in poultry. Repeated administration of feed can have a microorganism resistance effect, accumulation of antibiotic residues in animal and environmental products and imbalance of normal microflora in the intestine. The antibacterial and carbohydrate content of some natural ingredients can be potential as a replacement candidate for AGP. This study aims to determine the role of a combination of wild ginger, honey, and probiotics (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*) as AGP candidate in Vitro. The antibacterial activity of the combination of wild ginger and honey against pathogens (*E. coli*) and their use against probiotics was tested by disk diffusion method, while the calculation of optical density values to determine the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration was carried out on *E. coli*. The ability of inhibition of probiotics against pathogens is also done by the disk diffusion method. The disk diffusion test results showed the best combination was extract of 25% wild ginger aquades + 100% Lombok honey with inhibition zone diameter (8,53 ± 0,03). Optical density values indicate this combination is able to inhibit and kill *E. coli* (DO 0,00 ± 0,002) and support *B. subtilis* (DO 0,18 ± 0,002) and *L. acidophilus* (DO 0,25 ± 0,005) significantly better than positive control. MIC value of wild ginger aquades extract and honey combination against *E. coli* is wild ginger aquades extract 3.13% + Lombok honey 25%, while MBC value is wild ginger aquades extract 6,25% + Lombok honey 25%. The combination of *B. subtilis* and *L. acidophilus* showed the largest inhibitory zone diameter against *E. coli* (7,30 ± 0,02 mm) compared to individual colonies. The combination of wild ginger and honey, in addition to inhibiting also able to kill pathogens and support the growth of probiotics, so this formula can be used as one of the replacement candidates for AGP.

Key words: antibiotic growth promoter; *E. coli*; honey; probiotics; wild ginger

Abstrak

Antibiotik *Growth Promoter* digunakan untuk mencegah penyakit serta pemacu pertumbuhan dan produksi pada unggas. Pemberian berulang pada pakan dapat memberikan efek resistensi mikroorganisme, akumulasi residu antibiotik pada produk hewani dan lingkungan serta ketidakseimbangan mikroflora normal pada usus. Kandungan antibakteri dan karbohidrat pada beberapa bahan alami dapat berpotensi sebagai kandidat pengganti AGP. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran kombinasi temulawak, madu, dan probiotik (*Bacillus subtilis* dan *Lactobacillus acidophilus*) sebagai kandidat AGP secara *in Vitro*. Aktivitas antibakteri kombinasi temulawak dan madu terhadap patogen (*E. coli*) serta pemanfaatannya terhadap probiotik diuji dengan metode difusi *disk*, sedangkan perhitungan nilai densitas optikal untuk menentukan *minimum inhibitory concentration*

dan *minimum bactericidal concentration* dilakukan terhadap *E. coli*. Kemampuan daya hambat probiotik terhadap patogen juga dilakukan dengan metode difusi *disk*. Hasil uji difusi *disk* menunjukkan kombinasi terbaik adalah ekstrak aquades temulawak 25% + madu Lombok 100% dengan diameter zona hambat (8,53,03). Nilai densitas optikal menunjukkan kombinasi ini mampu menghambat dan membunuh *E. coli* (DO 0,00,002) serta mendukung *B. subtilis* (DO 0,18,002) dan *L. acidophilus* (DO 0,25,005) signifikan lebih baik dari kontrol positif. Nilai MIC kombinasi ekstrak aquades temulawak dan madu terhadap *E. coli* adalah ekstrak aquades temulawak 3,13% + madu Lombok 25%, sedangkan nilai MBC adalah ekstrak aquades temulawak 6,25% + madu Lombok 25%. Kombinasi *B. subtilis* dan *L. acidophilus* menunjukkan diameter zona hambat terbesar terhadap *E. coli* (7,30,02 mm) dibandingkan koloni individu. Kombinasi temulawak dan madu, selain menghambat juga mampu membunuh patogen serta mendukung pertumbuhan probiotik, sehingga formula ini dapat digunakan sebagai salah satu kandidat pengganti AGP.

Kata kunci: antibiotik *growth promoter*; *E. coli*; madu; probiotik; temulawak

Pendahuluan

Antibiotik digunakan dengan tujuan meningkatkan pertumbuhan dan produksi serta mencegah penyakit pada unggas. Efek positif tersebut dapat berubah fungsinya saat penggunaan antibiotik sudah tidak sesuai anjuran dan dosis yang ditetapkan (Bahri *et al.*, 2005) sehingga dapat memberikan efek negatif seperti resistensi mikroorganisme, pengurangan bakteri baik pada usus, serta residu antibiotik pada produk hewani dan lingkungan. Food and Agriculture Organization menyatakan bahwa kejadian resistensi antibiotik baik pada manusia maupun hewan telah mencapai tingkat mengkhawatirkan di sebagian besar belahan dunia dan kini telah diakui sebagai ancaman yang muncul secara signifikan terhadap kesehatan masyarakat global dan keamanan pangan (Food and Agriculture Organization, 2016). Solusi alternatif yang dilakukan saat ini ialah eksplorasi berbagai bahan alami untuk memanfaatkan kemampuan aktivitas antibakteri serta meningkatkan produktivitas ternak. Penelitian mengenai kombinasi jamu lengkuas, jahe, temulawak dan madu dengan berbagai konsentrasi terbukti dapat meningkatkan produktivitas dan berat karkas ayam broiler (Kusuma, 2018). Suplementasi pakan dengan probiotik *Lactobacillus*, *Bacillus*, dan *Clostridium* dapat meningkatkan pertumbuhan (Deniz *et al.*, 2011), pencernaan nutrisi (Mountzouris *et al.*, 2010), dan kekebalan humoral (Yang *et al.*, 2012). Penelitian ini dirancang untuk membentuk formula kombinasi temulawak dan madu serta probiotik yang belum pernah dilakukan sebelumnya. Tujuan

dari penelitian ini untuk mengetahui peran kombinasi temulawak, madu, dan probiotik (*Bacillus subtilis* dan *Lactobacillus acidophilus*) sebagai kandidat pengganti AGP secara *in Vitro*.

Materi dan Metode

Materi berupa alat yang digunakan adalah cawan petri, tabung reaksi, spatula, konikel, *autoclave*, *incubator*, refrigerator, pinset, ose, bunsen, mikroskop, spuit, *microplate*, *microplate reader*, jangka sorong digital, *centrifuge*, dan *vortex*. Bahan yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC® 11775 (patogen) dan *Bacillus subtilis* ATCC® 6633 (probiotik) yang diperoleh dari Balai Veteriner (BVET), serta *Lactobacillus acidophilus* (probiotik) yang diperoleh dari koleksi Pusat Antar Universitas (PAU) UGM, Yogyakarta, Indonesia, *Broth Heart Infusion* (BHI, Merck™), *phosphate buffered saline* (pH 7.4, Sigma™), *Mueller Hilton agar* (MHA, Merck™), ekstrak aquades temulawak (konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%), madu Lombok (konsentrasi 100%), aquades, *blank disk* (Oxoid™), antibiotik *chloramphenicol disk* (C 30µg, Oxoid™).

Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri adalah difusi *disk* Kirby-bauer (Bauer *et al.* 1966) yaitu kultur bakteri patogen dan probiotik yang telah dikultur pada masing - masing media diresuspensi dengan *Phosphate Buffered Saline* (pH 7,4, Sigma™) sampai konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Niamsa dan Sittiwet, 2009). *Blank disk* (Oxoid™) diteteskan sebanyak 50 µl (Valgas *et al.*, 2007) kombinasi ekstrak aquades temulawak dan madu kemudian diletakkan pada permukaan media

MHA (Merck™) yang masing - masing telah dikultur *E. coli*, *B. subtilis*, dan *L. acidophilus*. *Chloramphenicol disk* (C 30µg, Oxoid™) digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan aquades steril *disk* digunakan sebagai kontrol negatif kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat serta zona pertumbuhan disekitar *disk*. Zona hambat (*clear zone*) yang mengelilingi *disk* menggambarkan adanya aktivitas antibakterial dari bahan alami terhadap patogen, sedangkan zona pertumbuhan di sekitar *disk* menunjukkan kemampuan bahan alami untuk mendukung pertumbuhan kandidat probiotik.

Metode selanjutnya berupa dilusi untuk menghitung nilai densitas optikal pada *microplate 96-well* dengan dasar *round* yang dijelaskan dalam *Clinical and Standard Institute M07-A9* dan *Clinical Institute Standard Institute M11-A8* {CLSI M07-A9, (2012); CLSI M11-A8, (2012); Prakasita et al. (2019). Ekstrak kombinasi dengan volume 25 µl (dalam 100 µl media *broth*, BHI untuk media kultur *E. coli* dan *B. subtilis* serta MRS *broth* untuk media kultur *L. acidophilus*) diletakkan pada sumuran pertama, kemudian dilakukan pengenceran dua kali lipat pada setiap sumuran berikutnya hingga konsentrasi terendah 1,56%. Sepuluh mikroliter masing - masing suspensi bakteri dengan konsentrasi 1,5 x 10⁸ CFU/mL ditambahkan pada tiap sumuran. Media *broth* yang ditambahkan ekstrak herbal berbagai konsentrasi digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan media *broth* yang dikultur dengan masing - masing bakteri dengan konsentrasi 1,5 x 10⁸ CFU/mL digunakan sebagai kontrol positif. *Microplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian nilai densitas optikal media kultur dibaca pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 570 nm. Penentuan MIC merupakan hasil pengenceran empat kali dari konsentrasi awal ekstrak kombinasi terpilih yang dihitung nilai densitas optikalnya. Nilai densitas optikal yang menunjukkan angka 0,00 nm terhadap *E. coli* selanjutnya dikultur pada media MHA (Merck™) untuk menentukan MBC. Penentuan MBC dilakukan dengan teknik *lawning* (metode sebar) (Hacek et al., 1999). Larutan ekstrak kombinasi terpilih berdasarkan

hasil uji MIC diambil dari sumur plat mikrodilusi sebanyak 100 µl kemudian disebar pada 15 ml media MHA (Merck™) yang telah dipersiapkan kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Media agar yang tidak ditumbuhi bakteri ditetapkan sebagai MBC.

Pengujian antagonis probiotik terhadap patogen juga dilakukan dengan metode difusi *disk* (Son et al., 2017 ; Prakasita et al., 2019). Isolat kandidat probiotik yang sebelumnya telah dikultur pada media *broth* (Merck™) kemudian diresuspensi hingga konsentrasi 1,5 x 10⁸ cfu/ml, kemudian dikultur pada media MHA (Merck™) dengan metode agar tuang. Sebanyak 20 µl suspensi *B. subtilis*, *L. acidophilus* dan kombinasinya dengan konsentrasi 1 x 10⁶ cfu/ml diteteskan pada *blank disk* (Oxoid™). Kontrol positif yang digunakan adalah *Chloramphenicol disk* (C 30µg, Oxoid™) sedangkan *disk* yang diteteskan PBS sebagai pelarut suspensi dijadikan kontrol negatif. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dilakukan pengukuran diameter zona hambat (mm). Semua metode pengujian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan untuk meminimalisir hasil yang bias (Prakasita et al., 2019).

Hasil dan Pembahasan

Ekstrak aquades temulawak dengan berbagai konsentrasi dikombinasikan dengan madu Lombok. Kombinasi ini diharapkan dapat menghasilkan formulasi kombinasi ekstrak yang bekerja sinergis agar mampu menghasilkan efek terbaik terhadap pertumbuhan bakteri. Kombinasi ekstrak terbagi atas 5 kelompok yaitu, kombinasi ekstrak 1: ekstrak aquades 25% + madu Lombok; kombinasi ekstrak 2: ekstrak aquades 12,5% + madu Lombok; kombinasi ekstrak 3: ekstrak aquades 6,25% + madu Lombok; kombinasi ekstrak 4: ekstrak aquades 3,13% + madu Lombok; kombinasi ekstrak 5: ekstrak aquades 1,56% + madu Lombok. Hasil pengujian terhadap pertumbuhan ketiga bakteri disajikan pada Tabel 1, 2, 3.

Kombinasi ekstrak aquades temulawak konsentrasi 25% + madu Lombok konsentrasi 100% menunjukkan adanya zona hambat terbesar terhadap *E. coli* (Gambar 1) serta adanya zona pertumbuhan terhadap *B. subtilis* (Gambar 2A) dan *L. acidophilus* (Gambar 2B) yang lebih baik

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri kombinasi ekstrak aquades temulawak dan madu terhadap *E. coli*

| Kombinasi ekstrak | Konsentrasi ekstrak aquades | Diameter zona hambat terhadap <i>E. coli</i> (mm) | |
|-------------------|-----------------------------|---|--|
| | | Madu Lombok (100%) | |
| Temulawak | 25 % | 8,53,03 | |
| | 12,5 % | 7,34,02 | |
| | 6,25% | 6,65,02 | |
| | 3,13% | 6,95,04 | |
| | 1,56% | 6,96,03 | |

Tabel 2. Hasil uji difusi *disk* kombinasi aquades temulawak dan madu terhadap *B. subtilis*

| Kombinasi ekstrak | Konsentrasi ekstrak aquades | Diameter zona hambat terhadap <i>B. subtilis</i> (mm) | |
|-------------------|-----------------------------|---|--|
| | | Madu Lombok | |
| Temulawak | 25% | <6 | |
| | 12,5 % | <6 | |
| | 6,25% | 6,94,02 | |
| | 3,13% | 7,03,02 | |
| | 1,56% | 7,06,02 | |

Ket : <6 = zona hambat tidak terbentuk disekitar *disk*

Tabel 3. Hasil uji difusi *disk* kombinasi ekstrak aquades temulawak dan madu terhadap *L. acidophilus*

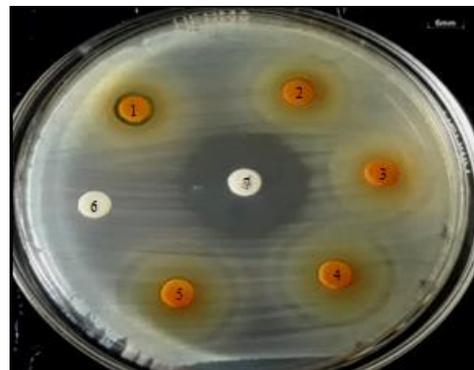
| Kombinasi ekstrak | Konsentrasi ekstrak aquades | Diameter zona hambat terhadap <i>L. acidophilus</i> (mm) | |
|-------------------|-----------------------------|--|--|
| | | Madu Lombok | |
| Temulawak | 25% | < 6 | |
| | 12,5 % | < 6 | |
| | 6,25% | < 6 | |
| | 3,13% | < 6 | |
| | 1,56% | < 6 | |

Ket : <6 = zona hambat tidak terbentuk disekitar *disk*

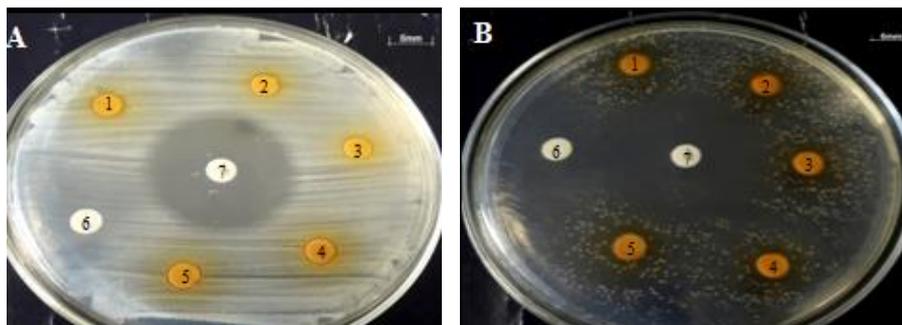
dan berbeda secara signifikan dengan kontrol positif ($P < 0,05$). Kombinasi yang menunjukkan diameter terbesar terhadap pertumbuhan *E. coli* serta mendukung pertumbuhan *B. subtilis* dan *L. acidophilus* dipilih untuk sebagai kombinasi ekstrak yang akan dihitung nilai densitas optikal untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (MIC) dan konsentrasi bunuh minimum (MBC) terhadap pertumbuhan *E. coli* serta untuk melihat kemampuan maksimal dari ekstrak kombinasi untuk mendukung pertumbuhan *B. subtilis* dan *L. acidophilus*

..Nilai densitas optikal ditentukan dari selisih nilai densitas optikal kombinasi ekstrak terpilih dengan nilai densitas optikal kontrol negatif (kombinasi ekstrak + media *broth* sesuai jenis bakteri). Hasil perhitungan nilai densitas optikal yang didapatkan merupakan hasil empat kali pengenceran dari konsentrasi awal ekstrak

kombinasi terpilih (25% dan 12,5% untuk ekstrak aquades temulawak dan 100% untuk madu). Data hasil pengujian disajikan pada Tabel 4.



Gambar 1. Hasil uji difusi *disk* kombinasi ekstrak aquades temulawak + madu Lombok dengan konsentrasi kombinasi ekstrak 1 (1), kombinasi ekstrak 2 (2), kombinasi ekstrak 3 (3), kombinasi ekstrak 4 (4), kombinasi ekstrak 5 (5), kontrol negatif (6), kontrol positif (7) terhadap *E. coli*.



Gambar 2. Hasil uji difusi disk kombinasi ekstrak aquades temulawak + madu Lombok dengan konsentrasi kombinasi ekstrak 1 (1), kombinasi ekstrak 2 (2), kombinasi ekstrak 3 (3), kombinasi ekstrak 4 (4), kombinasi ekstrak 5 (5), kontrol negatif (6), kontrol positif (7) terhadap *B. subtilis* (A) dan *L. acidophilus* (B).

Tabel 4. Nilai densitas optikal pada media yang diperkaya ekstrak aquades temulawak dan madu terhadap bakteri

| Kombinasi ekstrak (konsentrasi sebelum pengenceran) | Nilai denistas optikal terhadap bakteri (nm) | | |
|---|--|--------------------|-----------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>L. acidophilus</i> |
| Madu Lombok + ekstrak aquades temulawak 25% | 0,00,002 | 0,18,002 | 0,25,005 |
| Madu Lombok + ekstrak aquades temulawak 12,5% | 0,01,005 | 0,16,004 | 0,25,006 |
| Kontrol positif | 0,15,005 | 0,11,004 | 0,14,004 |

Secara umum, nilai densitas optikal kombinasi ekstrak aquades temulawak dengan madu yang dianalisis dengan statistik *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney* menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dengan kontrol positif. Hasil kombinasi ekstrak aquades temulawak 12,5% (diencerkan empat kali menjadi 3,13%) dengan madu Lombok 100% (diencerkan menjadi 25%) menunjukkan adanya penambahan nilai densitas optikal (0,01,005) yang dapat diinterpretasikan bahwa kombinasi ekstrak ini mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* namun belum mampu membunuh bakteri tersebut. Hasil berbeda ditunjukkan oleh kombinasi ekstrak aquades temulawak 25% (diencerkan empat kali menjadi 6,25%) dengan madu Lombok 100% (diencerkan menjadi 25%) yaitu tidak adanya penambahan nilai densitas optikal (0,00,002) yang dapat diinterpretasikan bahwa efek bakterisidal bekerja maksimal terhadap pertumbuhan *E. coli* sehingga bakteri ini tidak dapat bertumbuh dan berkembang dengan baik. Berdasarkan nilai densitas optikal yang didapatkan maka MIC kombinasi ekstrak aquades temulawak dan madu Lombok ialah kombinasi ekstrak aquades 3,13% + madu Lombok 25% dan MBC kombinasi ekstrak aquades temulawak dan madu Lombok adalah

kombinasi ekstrak aquades temulawak 6,25% + madu Lombok 25%. Pengujian lanjutan dilakukan untuk memastikan serta menentukan konsentrasi bunuh minimum (MBC) dengan metode sebar dilakukan pada larutan kombinasi ekstrak dari metode dilusi yang nilai densitas optikalnya 0,00. Hasil pengujian membuktikan bahwa kombinasi ekstrak aquades temulawak 25% (diencerkan empat kali menjadi 6,25%) dengan madu Lombok 100% (diencerkan menjadi 25%) mampu membunuh *E. coli* yang dibuktikan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media agar (MHA). Data hasil pengujian MIC dan MBC kombinasi ekstrak disajikan pada Tabel 5.

Perhitungan nilai denistas optikal dengan konsentrasi yang sama juga dilakukan pada kandidat probiotik. Nilai densitas optikal kedua kandidat probiotik yang dianalisis dengan statistik *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya

Tabel 5. MIC dan MBC ekstrak kombinasi terhadap *E. coli*

| Bakteri | Kombinasi ekstrak aquades temulawak + madu (%) | |
|----------------|---|---|
| | MIC | MBC |
| <i>E. coli</i> | Ekstrak aquades temulawak 3,13 + madu Lombok 25 | Ekstrak aquades temulawak 6,25 + madu Lombok 25 |

perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dengan kontrol positif. Penambahan nilai densitas optikal ditunjukkan oleh kandidat probiotik *B. subtilis* dan *L. acidophilus*. Kombinasi ekstrak aquades temulawak 12,5% (diencerkan empat kali menjadi 3,13%) dengan madu Lombok 100% (diencerkan empat kali menjadi 25%) dan kombinasi ekstrak aquades temulawak 25% (diencerkan empat kali menjadi 6,25%) dengan madu Lombok 100% (diencerkan empat kali menjadi 25%) menggambarkan kemampuan kombinasi ekstrak aquades temulawak dan madu Lombok untuk mendukung pertumbuhan kandidat probiotik. Efek yang sinergis antara kedua bahan alami ini, menyebabkan kandidat probiotik *B. Subtilis* dan *L. acidophilus* dapat bertumbuh dengan maksimal yang dibuktikan dengan nilai densitas optikal lebih tinggi dari kontrol positif (*media broth*).

Formulasi kombinasi ekstrak terbaik ditetapkan berdasarkan metode difusi, perhitungan nilai densitas optikal, penentuan MIC dan penentuan MBC. Ekstrak aquades temulawak 6,25 % + madu Lombok 25% (konsentrasi setelah empat kali pengenceran pada metode dilusi) ditetapkan sebagai kombinasi terbaik yang mampu membunuh *E. coli* serta mendukung pertumbuhan *B. subtilis* dan *L. acidophilus* dengan maksimal secara *in vitro*. Berdasarkan data hasil perbandingan MIC dan MBC dapat dilihat bahwa ekstrak aquades temulawak dengan konsentrasi 0,39% (3,9 mg/ml) sudah cukup mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* sedangkan untuk madu Lombok dan madu komersial dibutuhkan 25% (250 mg/ml) untuk menghambat pertumbuhan *E. coli*. Ekstrak individu temulawak maupun madu belum mampu membunuh *E. coli* sehingga MBC ekstrak individu tidak bisa ditentukan. Perbandingan hasil ini menunjukkan secara nyata bahwa dibutuhkan kombinasi kombinasi ekstrak aquades temulawak 6,25% (6,25 mg/ml) dan madu Lombok 25% (250 mg/ml) untuk membunuh *E. coli*. Formulasi ekstrak individu maupun kombinasi ekstrak dengan konsentrasi ini juga mampu mendukung pertumbuhan *B. subtilis* dan *L. acidophilus* secara maksimal.

Perbedaan aktivitas antibakteri dari setiap bahan uji dapat dipengaruhi oleh 4 faktor yaitu, konsentrasi ekstrak, kandungan senyawa

metabolit, daya difusi ekstrak dan jenis bakteri yang dihambat (Jawetz *et al.*, 1996). Pelczar dan Chan (1988), menyatakan bahwa salah satu faktor yang mempengaruhi aktivitas bahan antimikroba, yaitu konsentrasi bahan antimikroba. Daya hambat yang dihasilkan oleh bahan antimikroba akan semakin tinggi apabila konsentrasinya juga tinggi (Amrie *et al.*, 2014). Faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil diameter zona hambat dengan metode Kirby-Bauer adalah kemampuan ekstrak untuk berdifusi kedalam kertas cakram. Ekstrak yang digunakan dalam uji ini termasuk dalam ekstrak kental. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan maka semakin tinggi pula viskositasnya (Madan dan Singh, 2010). Menurut Priyatmoko (2008), semakin tinggi viskositas suatu ekstrak maka proses difusi suatu zat antibakteri kedalam media akan semakin rendah sehingga akan mempengaruhi hasil diameter zona hambat.

Rimpang temulawak memiliki senyawa utama antimikroba yang khas yaitu xanthorrhizol (XNT) dari golongan terpenoid yang lebih besar ($\geq 6\%$) dibandingkan pada kunyit ($\geq 3\%$). Temulawak secara umum mengandung senyawa antibakterial yang termasuk dalam golongan minyak atsiri (Sidik *et al.*, 1995 ; Hernani dan Haryani, 2001). Aktivitas antimikroba dari setiap jenis minyak atsiri dapat dipengaruhi oleh jenis dan jumlah komponen aktif yang dikandungnya, varietas atau kultivar, faktor iklim dan tanah tempat tumbuh/daerah asal, bentuk rimpang segar atau kering, serta metode ekstraksi dan jenis pelarut yang digunakan (Burt, 2004). Demikian pula untuk produksi bahan aktif lain seperti senyawa - senyawa terpenoid dalam minyak atsiri juga sangat dipengaruhi oleh kondisi geografis habitat tumbuhan serta faktor - faktor spesifik lain yang berpengaruh yang belum diketahui (Li *et al.*, 2011).

Menurut Hidayathulla *et al.* (2011), ekstraksi aquades, methanol, etil asetat, dan n-heksan akan menghasilkan larutan yang mengandung senyawa terpenoid, fenol dan alkaloid karena tingkat kepolaran pelarut yang digunakan sama, yaitu dari pelarut polar sampai semi polar atau non polar. Siswandono dan Soekardjo (1995), menyatakan bahwa turunan senyawa fenol akan berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses

adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen dan dapat merubah permeabilitas membran sel. Penetrasi fenol dengan kadar yang tinggi ke dalam sel dapat menyebabkan koagulasi protein dan lisis pada membran sel, sedangkan senyawa fenol dengan konsentrasi rendah dapat membentuk ikatan lemah dan mudah terurai sehingga apabila terjadi penetrasi fenol ke dalam sel dapat menyebabkan koagulasi protein dan lisis pada membran sel dapat terjadi (Parwata dan Dewi, 2008).

Mekanisme peran antibakteri lainnya dari unsur minyak atsiri yaitu terpenoid yang diduga melibatkan pemecahan membran oleh komponen - komponen lipofilik (Cowan, 1999) dan kurkumin yang memiliki efek fototoksik terhadap bakteri ketika terkena cahaya dengan memproduksi hidrogen peroksida yang dapat menyebabkan kerusakan membran sitoplasma (Dahl *et al.*, 1989). Terpenoid, phenol, dan hidrogen peroksida diduga bekerja pada bakteri dengan cara merusak membran sitoplasma, hal ini mengakibatkan ion anorganik yang penting (trace element yaitu Fe, Cu, Zn), nukleotida, koenzim, dan asam amino merembes keluar sel, sertamencegahmasuknyabahan-bahanmakanan atau nutrisi yang diperlukan bakteri untuk menghasilkan energi (Volk dan Wheeler, 1993). Membran sitoplasma bertugas melaksanakan metabolisme energi dalam sel - sel prokariotik sehingga, jika membran sitoplasma rusak maka metabolisme energi tidak akan berlangsung. Hal inilah yang menyebabkan ketidakmampuan sel untuk tumbuh dan menyebabkan kematian sel. Ekstrak aquades jahe merah dan temulawak dengan masing - masing kosentrasi terbukti mampu menghambat *E. coli* yang dibuktikan dengan adanya penurunan nilai densitas optikal larutan berbagai konsentrasi ekstrak, jika dibandingkan dengan kontrol positif.

Beberapa studi menunjukkan bahwa umumnya minyak atsiri lebih aktif terhadap bakteri Gram positif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Bisping dan Amtsberg (1988), menyatakan bahwa reaksi yang disebabkan oleh senyawa fenolik herbal akan berpengaruh terhadap dinding sel bakteri. Penyusunan dinding sel yang sederhana pada bakteri Gram positif dan tidak adanya selaput luar menyebabkan senyawa antibakteri dapat menembus dinding sel

serta mengganggu proses biosintesis dinding sel (Ajizah *et al.*, 2007). Penelitian sebelumnya terkait penggunaan temulawak sebagai bahan fitobiotik telah banyak dilakukan, namun kemampuannya untuk mengontrol pertumbuhan *E. coli* (APEC) masih jarang diteliti secara *in vitro*.

Zhou *et al.* (2016), menyatakan bahwa kandungan polifenol pada ekstrak herbal merupakan senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi untuk mengatasi radikal bebas dan berperan dalam mengatasi stres oksidatif yang dihasilkan oleh aktivitas metabolik dengan menyediakan lingkungan mikroaerofilik bagi probiotik. Kandungan minyak atsiri pada herbal juga mampu merangsang dan meningkatkan pertumbuhan bakteri menguntungkan (misalnya, *Lactobacilli* dan *Bifidobacteria*) pada usus (Vidanarachchi *et al.*, 2006). Pendapat lain oleh Xue dan Meng (1996), menyatakan bahwa komponen polisakarida dianggap sebagai komponen aktif imun yang paling penting.

Penelitian sebelumnya mengenai kemampuan ekstrak kombinasi ekstrak temulawak dan ekstrak jahe merah untuk mendukung pertumbuhan *L. acidophilus* yang dilakukan oleh Prakasita *et al.* (2019), membuktikan bahwa kombinasi ekstrak etanol jahe merah maupun ekstrak aquades temulawak mampu mendukung pertumbuhan kandidat probiotik ini serta meningkatkan kemampuan adhesi yang lebih baik dari bakteri patogen pada sel epitel usus ayam. Penjelasan lain mengenai mekanisme senyawa pada herbal yang mendukung hasil penelitian ini disampaikan oleh Bisping dan Amtsberg (1988), bahwa perbedaan ketebalan dinding sel bakteri non patogen dan patogen berpengaruh terhadap reaksi yang disebabkan oleh senyawa fenolik. Dinding sel bakteri non patogen akan mengalami dehidrasi sehingga pori - pori akan mengecil sehingga menyebabkan daya rembes dinding sel dan fungsi membran menurun dan meminimalisir kerusakan dinding sel probiotik.

Aktivitas antibakteri madu dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kadar gula yang tinggi, kelembaban yang rendah, pH yang rendah, dan hidrogen peroksida (Kwakman dan Zaat, 2012). Pendapat lain oleh Aggad dan Guemour (2014), menyatakan bahwa aktivitas

antibakteri pada madu dipengaruhi oleh osmolaritas, pH, aktivitas senyawa peroksida dan non peroksida. Mekanisme aktivitas antibakteri yang berkaitan dengan osmolaritas madu diakibatkan daya osmosis madu yang tinggi, karena 84% komponen kandungan madu adalah glukosa dan fruktosa sedangkan air hanya berkisar 15 - 21% (Nadhilla, 2014). Osmolaritas menyebabkan interaksi kuat antara molekul gula dengan molekul air dan meninggalkan molekul air yang sedikit untuk bakteri, sehingga pertumbuhan bakteri sulit terjadi (Suranto 2004). Faktor lain berupa hidrogen peroksida yang terkandung dalam madu dihasilkan oleh proses glukosa oksidase merupakan komponen penting yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Molan, 2006). Madu juga mengandung senyawa flavonoid yang dapat merusak dinding sel bakteri yang bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid sehingga flavonoid dapat masuk ke dalam inti sel dan bereaksi dengan DNA dan menyebabkan bakteri lisis kemudian mati (Lingga dan Rustama, 2005). Hasil ini juga sesuai dengan penelitian Astrini *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa madu pahit memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji Gram negatif maupun Gram positif.

Madu mengandung karbohidrat sekitar 80% yang terdiri dari monosakarida, polisakarida (Landry *et al.*, 2016), dan oligosakarida (Karimah *et al.*, 2011). Kandungan oligosakarida telah banyak digunakan dalam berbagai produk makanan dengan tujuan sebagai sumber prebiotik yang merupakan komponen pangan yang tidak tercerna dan memberikan keuntungan melalui modulasi mikroba yang berguna bagi kesehatan usus besar (probiotik) (FAO 2007). Karimah (2010), menyatakan bahwa aktivitas prebiotik isolat oligosakarida madu lokal asal Sumbawa memiliki aktivitas prebiotik yang lebih tinggi dibanding dengan inulin yang merupakan prebiotik komersil. Rosendale *et al.* (2008), juga membuktikan adanya efek sinergis dari madu Manuka (UMF 20+) yang dapat meningkatkan pertumbuhan probiotik (*L. reuteri*, *L. rhamnosus*, dan *B. lactis*) dan menghambat patogen (*S. typhimurium*, dan *S. aureus*). Gibson dan Roberfroid (1995), juga menyatakan bahwa mikroflora normal seperti *Lactobacillus* dan *bifidobacteria* akan mem-

fermentasi oligosakarida pada madu yang tidak dapat dicerna, untuk kepentingan metabolisme bakteri tersebut sehingga dapat memberikan keuntungan bagi tubuh inang. Kandungan prebiotik pada madu juga dapat menjaga pertumbuhan dan stabilitas spesies (Gibson *et al.*, 2010).

Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Zhou *et al.* (2016) yang membuktikan bahwa pemberian formulasi kombinasi herbal pada ayam broiler berpotensi menjaga keseimbangan mikroflora normal pada saluran pencernaan. Kusuma (2018), juga menunjukkan bahwa pemberian kombinasi jamu lengkuas, jahe, temulawak, dan madu dengan berbagai konsentrasi terbukti dapat meningkatkan produktivitas, dan berat karkas ayam broiler. Peningkatan produktivitas ayam broiler paling baik ditunjukkan setelah pemberian kombinasi jamu selama 17 hari dengan konsentrasi 2,5%. Pendapat lain oleh Cavallini *et al.* (2009), menyatakan bahwa probiotik juga dapat menurunkan aktivitas acetyl coenzim A carboxylase yaitu enzim yang bertanggung jawab terhadap laju sintesis asam lemak, dengan cara menghasilkan statin sebagai inhibitor pembentukan lemak di dalam hati. Ashayerizadeh *et al.* (2011), menunjukkan penggunaan probiotik yang dilengkapi dengan prebiotik dapat meningkatkan efisiensi energi dan protein serta dapat menurunkan kandungan kolesterol darah daripada penggunaan probiotik dan prebiotik secara parsial. Penambahan probiotik dan prebiotik tidak berpengaruh negatif terhadap ayam broiler sehingga memiliki pertumbuhan yang sama dengan ayam yang diberi antibiotik, bahkan dapat meningkatkan aktivitas antioksidan sehingga oksidasi lemak dapat dihambat (Aristides *et al.*, 2012).

Pengujian sifat antagonis antara probiotik dan patogen dengan metode difusi Kirby - bauer dilakukan untuk mengetahui kemampuan *B. subtilis* dan *L. acidophilus* untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* (Gambar 3). Data diameter zona hambat yang dihasilkan, dapat dilihat pada Tabel 6.

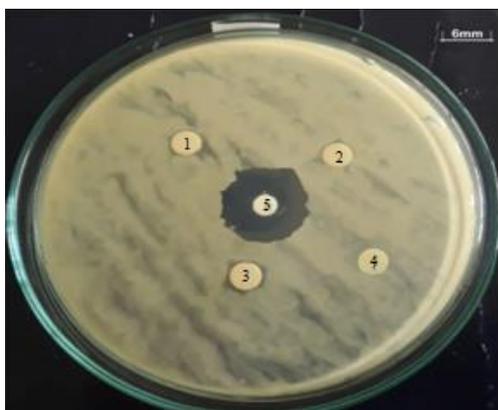
Kandidat probiotik *B. subtilis*, *L. acidophilus* dan kombinasinya menunjukkan adanya kemampuan menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan diameter zona hambat yang lebih dari 6 mm disekitar *disk* yang masing - masing me-

ngandung *B. subtilis*, *L. acidophilus*, kombinasi *B. subtilis* + *L. acidophilus*, dan kontrol positif (*Chloramphenicol*), sedangkan kontrol negatif (PBS) tidak menunjukkan adanya zona hambat disekitar *disk*. Hasil perhitungan diameter zona hambat yang dianalisis dengan statistik Anova *One way* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada masing - masing bakteri dan juga kombinasi kedua bakteri tersebut ($P < 0,05$). *B. subtilis* menunjukkan diameter zona hambat yang lebih besar (7,18,02) dibandingkan *L. acidophilus* (6,95,03), namun kombinasi kedua kandidat probiotik memiliki diameter zona hambat yang paling baik yaitu 7,30,02 dan signifikan berbeda ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kandidat probiotik individu.

Tabel 6. Hasil uji difusi *disk B. subtilis, L. acidophilus* dan kombinasinya terhadap pertumbuhan *E. coli*

| Kandidat probiotik | Diameter zona hambat kandidat probiotik terhadap <i>E. coli</i> (mm) |
|-----------------------|--|
| <i>B. subtilis</i> | 7,18 ,02 |
| <i>L. acidophilus</i> | 6,95 ,03 |
| Kombinasi | 7,30 ,02 |

Aktivitas antibakteri oleh probiotik dipengaruhi oleh beberapa faktor penting. Sinha (1986), melaporkan bahwa metabolit utama bakteri asam ialah asam lemak rantai pendek dan asam laktat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen di usus seperti *E. coli*. *Lactobacillus acidophilus* menghasilkan dua komponen bacteriocin yaitu bacteriosin lactacin B, dan acidolin yang merupakan komponen ekstraseluler berupa peptida atau senyawa berupa protein antimikroba yang dapat membe-



Gambar 3. Hasil uji aktivitas antibakteri kandidat probiotik *B. subtilis* (1), *L. acidophilus* (2), kombinasi (3), kontrol negatif (4), kontrol positif (5) terhadap *E. coli*.

rikan respon antagonis dengan menghambat berkembangnya organisme patogen (Jagadesswari, 2010). Hal serupa juga ditunjukkan oleh mekanisme penghambatan *B. subtilis* yang menghasilkan antibiotik bersifat toksik terhadap mikroba lain seperti iturin A yang merupakan lipoprotein, subtilin yang merupakan senyawa peptida, dan basitrasin. Basitrasin merupakan polipeptida yang bekerja menghambat pembentukan dinding sel (Soesanto, 2008).

Probiotik dapat menjadi alternatif potensial pengganti antibiotik untuk menghambat pertumbuhan serta mengurangi kolonisasi patogen enterik pada usus unggas (FAO, 2016). Penelitian yang dilakukan oleh El-Naggar (2004) menyatakan bahwa secara *in vitro* *B. subtilis* memiliki aktivitas antagonis terhadap patogen *E. coli* O157:H7 dan *S. thyphimurium* yang lebih baik dibandingkan dengan *Lactobacilli*. Manin (2009) juga menyatakan bahwa penggunaan probiotik seperti *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, dan *L. acidophilus* melalui air minum dilaporkan dapat menggantikan peran antibiotik, menjaga kesehatan saluran pencernaan ternak serta menurunkan jumlah *E. coli*. Pendapat lainya oleh Fuller (1989), menjelaskan bahwa konsentrasi $10^7 - 10^8$ CFU/g dari *Lactobacillus* efektif menekan pertumbuhan bakteri patogen secara signifikan karena penurunan keasaman atau pH dari produksi asam laktat.

Kesimpulan

Kombinasi ekstrak aquades temulawak dengan madu Lombok merupakan formulasi yang dapat dijadikan sebagai pengganti AGP. Pertumbuhan kombinasi probiotik *B. subtilis*, dan *L. acidophilus* efektif menghambat pertumbuhan *E. coli*.

Daftar Pustaka

- Ajizah, A., Thihana., Mirhanuddin. (2007). Potensi Ekstrak Kayu Ulin (Euksideroxyton Zwageri) Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus Aureus Secara In Vitro. Bioscientiae. 4 (1): 37-42.
- Amrie, A.G.A, Ivan., Anam, S., Ramadhanil. (2014). Uji Efektifitas Ekstrak Daun Dan Akar Harrisonia Perforata Merr. Terhadap

- Pertumbuhan Bakteri *Vibrio Cholerae*. *Jurnal Of Natural Science*. 3(3):331-340.
- Aristides, L. G. A., Paiao, F. G., Murate, L. S., Oba, A., dan Shimokomak, M. (2012). The effects of biotic additives on growth performance and meat qualities in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 11(9): 599–604.
- Ashayerizadeh, A., Dabiri, N., Mirzadeh K., dan Ghorbani, M. (2011). Effect of dietary supplementation of probiotic and prebiotic on growth indices and serum biochemical parameters of broiler chickens. *J. Cell Anim. Biol*. 5: 152-156.
- Astrini, D., Wibowo, M.S., Nugrahani, I. (2014). Aktivitas Antibakteri Madu Terhadap Bakteri Gram Negatif Dan Gram Positif serta Potensinya Dibandingkan Terhadap Antibiotik Kloramfenikol, Oksitetrasiklin dan Gentamisin. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 39(3): 75.
- Bahri, S., Masbulan, E., Kusumaningsih, A. (2005). Proses Praproduksi Sebagai Faktor Penting Dalam Menghasilkan Produk Ternak Yang Aman Untuk Manusia. *J. Litbang Pertanian*, 24(1).
- Bisping, W., Amtsberg, G.A. (1988). *Color Atlas for The Diagnosis of Bacterial Pathogen in Animals*. Paul Parey Scientific Publishers. Berlin and Hamburg : 160-168.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in food-a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Cavallini, D. C. U., Bedani, R., Bomdespacho, L. Q., Vendramini, R. C., dan Rossi, E. A. (2009). Effects of probiotic bacteria, iso-flavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: a randomized double-blind study. *Lipids in Health and Disease*, 8(1): 1–8.
- Cowan, M.M. (1999). Plant Products As Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564 – 582.
- Dahl, T.A., W.R. Midden., dan P.E. Hartman. (1989). Comparison Of Killing Of Gram-negatif And Gram-Positif Bacteria By Pure Singlet Oxygen. *J. Bacteriol*. 171: 2188-2194.
- Deniz, G., A. Orman, F. Cetinkaya, H. Gencoglu, Y. Meral, And I. I. Turkmen. (2011). Effects Of Probiotic (*Bacillus Subtilis* DSM 17299) Supplementation On The Caecal Microflora And Performance In Broiler Chickens. *Revue Méd. Vét*. 162: 538–545.
- El-Naggar Moustofa, Y.M. (2004). Comperative study of probiotic cultures to control the growth of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salonella typhimurium*. *Biotechnology*, 3 (2): 173-180.
- Food And Agriculture Organization Of The United Nations (FAO). (2016). *Probiotics In Animal Nutrition – Production, Impact And Regulation* By Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart And Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. FAO Animal Production And Health Paper No. 179, Rome, 5: 15-31.
- FAO.(2007). FAO Technical Meeting On Prebiotics. ISBN 92-5-105513-0.
- Fuller, R. (1989). Probiotic in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
- Gibson, G.R., dan M.B. Roberfroid. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr*. 125: 1401-1412.
- Gibson, G. R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Ferrandon, A.D., Gareau, M., Murphy, E.F., Saulnier, D., Loh, G., Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Wijnkoop, I. L., Walker, C., and Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *The Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 7: 1–19.
- Hacek, M.D., Dressel C.D., dan Peterson, R.L. (1999). Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macro-dilution Technique. *J Clin Microbiol*. 37(6): 1881–1884.

- Hernani dan Hayani, E. (2001). Identification of Chemical Components on Red Ginger (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) by GC-MS. Proc. International Seminar on Natural Products Chemistry and Utilization of Natural Resources : 501-505.
- Hidayathulla, S., C.K. Keshava, dan K.R. Chandrashekar. (2011). Phytochemical Evaluation And Antibacterial Activity Of *Pterospermum Diversifolium* Blune. Int.J.Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences. 3(2): 165-167.
- Jagadesswari, S., Vidya, P. (2010). Isolation And Characterization Of Bacteriocin Producing *Lactobacillus* Sp. From Traditional Fermented Food. Electronic Journal Of Environmental Agricultural And Food Chemistry. 9(3):575-581.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg. (1996). Mikrobiologi Kedokteran, edisi 20. EGC. Jakarta.
- Karimah U. (2010). Isolasi Oligosakarida Madu Lokal Dan Analisis Aktivitas Prebiotiknya. Skripsi. Bogor. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Karimah, U., Anggowo, Y.N., Falah, S., Suryani. (2011). Isolasi Oligosakarida Madu Lokal Dan Analisis Aktivitas Prebiotiknya. J Gizi Pangan. 6: 217–224.
- Kusuma, S.B. (2018). Pemanfaatan Kombinasi Jamu Lengkuas, Jahe, Temulawak Dan Madu Terhadap Produktivitas Ayam Broiler. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kwakman, P. H. S., dan Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial Components of Honey. IUBMB Life. 64(1): 48–55.
- Landry, B.K,U., Moumita, S., Jayabalan, R., François, Z.N. (2016). Honey, probiotics and prebiotics: Review. J Pharm Chem Biol Sci. 7: 24–28.
- Li, S., Yuan, W., Wang., P., Yang, P., Aggarwal, B. B. (2011). Chemical composition and product quality control of turmeric (*C. longa* L.). Pharm. crops. 2: 28-54.
- Lingga, M.E., dan Rustama, M.M. (2005). Uji Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak Air Dan Etanol Bawang Putih (*Allium Sativum* L.) Terhadap Bakteri Gram Negatif Dan Gram Positif Yang Diisolasi Dari Udang Dogol (*Metapenaeus Monoceros*), Udang Lobster (*Panulirus* Sp) Dan Udang Rebon (*Mysis* Dan *Acetes*). Jurnal Biotika. 5 (2).
- Madan, J., dan Singh, R. (2010). Formulation And Evaluation Of Aloe Vera Topical Gels, Int.J.Ph.Sci. 2 (2): 551-555.
- Manin, F. (2009). Potensi *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum* dari Saluran Pencernaan Ayam Buras Asal Lahan Gambut sebagai Sumber Probiotik. Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan. 8 (5): 221-228.
- Molan, P.C. (2006). Using Honey in Wound Care. International Journal of Clinical Aromatherapy France. 3(3): 21-24.
- Mountzouris, K. C., P. Tsitsrikos, I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzmayr, dan K. Fegeros. (2010). Effects Of Probiotic Inclusion Levels In Broiler Nutrition On Growth Performance, Nutrient Digestibility, Plasma Immunoglobulins, And Cecal Microflora Composition. Poult. Sci. 89: 58–67.
- Nadhilla, N.F. (2014). The Activity Of Antibacterial Agent Of Honey Against *Staphylococcus Aureus*. Jurnal Majority. 3(7): 96-98.
- Niamsa, N., dan Sittiwet C. (2009). Antimicrobial activity of curcuma longa aqueous extract. Journal of Pharmacology and Toxicology, 4: 173-177.
- Parwata, I.M., O.A., dan P.F.S. Dewi. (2008). Isolasi Dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Dari Rimpang Lengkuas (*Alpina Galanga* L). J.Kimia. 2(2): 100-104.
- Pelczar, M.J., dan E.C.S. Chan. (1986). Dasar-dasar mikrobiologi 2. Universitas Indonesia. Jakarta: 489-522.
- Prakasita, V.C., Asmara, W., Widyarini, S., Wahyuni, A.E.T.H. (2019). Combinations Of Herbs And Probiotics As An Alternative

- Growth Promoter : An *In Vitro* Study. Veterinary World. EISSN : 2231-0916.
- Priyatmoko, W. (2008). Aktivitas Antibakteri Karang Lunak Hasil Transplantasi (*Sinularia* Sp.) Pada Dua Kedalaman Berbeda Di Perairan Pulau Pramuka Kepulauan Seribu, Dki Jakarta. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rosendale, D. I., Maddox, I. S., Miles, M. C., Rodier, M., Skinner, M., Sutherland, J. (2008). High-throughput microbial bioassays to screen potential New Zealand functional food ingredients intended to manage the growth of probiotic and pathogenic gut bacteria. *International Journal of Food Science and Technology*. 43: 2257–2267.
- Sidik, Mulayono, M.W., dan Muhtadi, A. (1995). *Temulawak (Curcums xanthorrhiza Roxb)*. Yayasan Pengembangan dan Pemanfaatan Obat Bahan Alam. Jakarta.
- Sinha, B. B., Sampath, K. T., Khan, M. Y. (1986). Effect of feeding heat treated groundnut cake on growth and certain blood constituents in crossbred calves. *Indian J. Nutr. Diet.* 23 (2): 45-50.
- Soesanto, L. (2008). Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman. PT, Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Suranto, A. (2004). Khasiat Dan Manfaat Madu Herbal. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Vidanarachchi, J. K. (2006). Regulation of intestinal microflora and productivity of broiler chickens by prebiotic and bioactive plant extracts. Thesis. Faculty of Science, University of New England Armidale. Australia.
- Volk, W.A., dan Wheeler, M.F. (1993). Mikrobiologi Dasar III. Erlangga. Jakarta.
- Yang, C. M., G. T. Cao, P. R. Ferket, T. T. Liu, L. Zhou, L. Zhang, Y. P. Xiao, dan A. G. Chen. (2012). Effects Of Probiotic, *Clostridium Butyricum*, On Growth Performance, Immune Function, And Cecal Microflora In Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 91: 2121–2129.
- Zhou, Q., Wang, S., Yang, G., Zhao, W., dan Li, H.L. (2016). Development and Evaluation of Herbal Formulation with Antipathogenic Activities and Probiotics Stimulatory Effect. *Journal Integrative Agriculture*. 15 (5): 1103-1111.