

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBUCHA BUNGA TELANG  
(*Clitoria ternatea* L.) BIRU TERHADAP *Escherichia coli* EXTENDED  
SPECTRUM  $\beta$ -LACTAMASE PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH  
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
MUNAWWAROTUL KHANIFAH  
NIM. 18620030**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBUCHA BUNGA TELANG  
(*Clitoria ternatea* L.) BIRU TERHADAP *Escherichia coli* EXTENDED  
SPECTRUM  $\beta$ -LACTAMASE PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH  
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
MUNAWWAROTUL KHANIFAH  
NIM. 18620030**

**diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si.)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2020**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBUCHA BUNGA TELANG  
(*Clitoria ternatea* L.) BIRU TERHADAP *Escherichia coli* EXTENDED  
SPECTRUM  $\beta$ -LACTAMASE PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH  
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

**SKRIPSI**

**Oleh:**  
**MUNAWWAROTUL KHANIFAH**  
**NIM. 18620030**

telah diperiksa dan disetujui untuk diuji  
tanggal: 4 Oktober 2022

Dosen Pembimbing I

  
Prilya Dewi Nitriasari, M.Sc.  
NIP. 19900428 2016080 1 2062

Dosen Pembimbing II

  
Dr. M. Imamuddin, Lc., M.A.  
NIP. 19740602 200901 1 010

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Studi Biologi  
  
Yusuf Hidayatullah Savitri, M.P.  
NIP. 19741018 200312 2 002

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBUCHA BUNGA TELANG  
(*Clitoria ternatea* L.) BIRU TERHADAP *Escherichia coli* EXTENDED  
SPECTRUM  $\beta$ -LACTAMASE PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH  
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MUNAWWAROTUL KHANIFAH**  
NIM. 18620030

telah dipertahankan  
di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai  
salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si.)  
Tanggal: 16 November 2022

Ketua Penguji : Ir. Liliek Harianie AR, M.P.  
19620901 199803 2 001  
Anggota Penguji 1 : Fitriyah, M.Si.  
19860725 201903 2 013  
Anggota Penguji 2 : Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc.  
19900428 2016080 1 2062  
Anggota Penguji 3 : Dr. M. Imamuddin, Lc., M.A.  
19740602 200901 1 010

(.....)  
(.....)  
(.....)  
(.....)

Mengesahkan,  
Program Studi Biologi



Sandi Savitri, M.P.  
NIP. 19741018 200312 2 002

## HALAMAN PERSEMBAHAN

الحمد لله رب العالمين

**Puji syukur kehadiran Allah, shalawat dan salam bagi Rasul-Nya**

**Penulis persembahkan sebuah karya ini kepada:**

Kedua orang tua penulis tercinta, Bapak Ali Muchsin dan Ibu Asrotun serta saudara penulis, Imroatut Taslimah yang selalu memberikan motivasi yang tak terhingga.

Dosen pembimbing penulis Ibu Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc. dan Bapak Dr. M. Imamuddin, Lc., M.A. yang telah dengan sabar membimbing jalannya penelitian skripsi ini dan selalu memberikan motivasi untuk tetap semangat menjalani setiap tahap ujian skripsi.

Seluruh dosen Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, dan seluruh guru-guru penulis yang telah membimbing dan memberikan ilmunya yang sangat bermanfaat.

Sahabat seperjuangan mulai pertama kali penulis menginjakkan kaki di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang selalu mendukung dan selalu semangat untuk belajar bersama tanpa menjatuhkan. Keluarga Biologi, keluarga Booster (Biologi angkatan 2018), kakak tingkat dan adik tingkat yang telah memberikan semangat dan doanya.

Orang-orang yang penulis sayangi, yang tak bisa penulis sebutkan satu persatu yang selalu memberikan semangat dan motivasinya kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.

Penulis ucapkan terima kasih yang luar biasa. Semoga ukhuwah kita tetap terjaga dan selalu diridhoi Allah SWT. Aamiin Allahumma Aamiin

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Munawwarotul Khanifah  
NIM : 18620030  
Program Studi : Biologi  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Aktivitas Antibakteri Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Biru terhadap *Escherichia coli* Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Penyebab Penyakit Infeksi Saluran Kemih secara *In Vitro* dan *In Silico*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 7 Oktober 2022  
Yang membuat pernyataan,



Munawwarotul Khanifah  
NIM. 18620030

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBUCHA BUNGA TELANG  
(*Clitoria ternatea* L.) BIRU TERHADAP *Escherichia coli* EXTENDED  
SPECTRUM  $\beta$ -LACTAMASE PENYEBAB INFEKSI SALURAN KEMIH  
SECARA *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

Munawwarotul Khanifah, Prilya Dewi Fitriasari, dan M. Imamuddin

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri  
Maulana Malik Ibrahim Malang

**ABSTRAK**

Faktor penyebab paling umum infeksi saluran kemih (ISK) yaitu bakteri *Escherichia coli*. Penggunaan antibiotik pada pengobatan ISK secara luas dapat menyebabkan resistensi *E. coli* yang menghasilkan *extended spectrum  $\beta$ -lactamase* (ESBL). Kombucha bunga telang biru memiliki berbagai kandungan seperti asam asetat dan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai senyawa *antibacterial*. Tujuan penelitian ini adalah: 1) mengetahui kadar total asam, pH, dan antosianin total pada kombucha bunga telang biru; 2) mengetahui aktivitas antibakteri serta nilai KHM dan KBM kombucha bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL; 3) mengetahui aktivitas *inhibitor* senyawa khas bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL penyebab ISK secara *in silico*. Penelitian ini bersifat deskriptif eksploratif dan eksperimental. Uji secara *in vitro* menggunakan RAL dengan kelompok perlakuan terdiri dari K1 (20%), K2 (30%), K3 (40%), K4 (50%), K+ (meropenem), K- (akuades steril). Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran dan metode dilusi (uji KHM dan KBM). Uji secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking* antara reseptor *E. coli* ESBL dengan ligan senyawa aktif bunga telang biru. Parameter *in silico* yang digunakan yaitu karakter farmakokinetik, nilai PASS, dan energi bebas ( $\Delta G$ ). Analisis data menggunakan ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%. Hasil menunjukkan kadar total asam, pH, dan antosianin total tertinggi terdapat pada perlakuan K4 (50%) dengan nilai secara berturut-turut 1.46475%, 2.585, dan 88,3955 mg/L. Aktivitas antibakteri kombucha bunga telang biru ditunjukkan dengan terdapatnya zona hambat dengan nilai tertinggi 6,9 mm dan nilai terendah 2 mm. Hasil uji KHM menunjukkan positif pada konsentrasi 40% dan hasil uji KBM masih menunjukkan koloni bakteri hidup pada semua perlakuan. Hasil *molecular docking* menunjukkan senyawa khas clitorin dan ternatin pada bunga telang biru memiliki potensi dalam penghambatan ESBL.

Kata kunci: antibakteri, *E. coli* ESBL, *in silico*, *in vitro*, kombucha bunga telang biru



**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF BLUE BUTTERFLY PEA FLOWER  
(*Clitoria ternatea* L.) KOMBUCHA AGAINST *Escherichia coli* EXTENDED  
SPECTRUM  $\beta$ -LACTAMASE CAUSES URINARY TRACT INFECTIONS  
BY *IN VITRO* DAN *IN SILICO***

Munawwarotul Khanifah, Prilya Dewi Fitriasari, and M. Imamuddin

Biology Study Program, Faculty of Science and Technology, The State Islamic  
University of Maulana Malik Ibrahim Malang

**ABSTRACT**

The most common cause of urinary tract infection (UTI) is *E. coli* bacteria. The widespread use of antibiotics in the treatment of UTI can cause *E. coli* resistance which produces Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL). Blue butterfly pea flower kombucha has various ingredients such as acetic acid and secondary metabolites that have potential as antibacterial compound. The purpose of this research were: 1) determine the total acid content, pH, and total anthocyanin of blue butterfly pea flower kombucha; 2) determine the antibacterial activity, MIC, and MBC of blue butterfly pea flower kombucha against *E. coli* ESBL; 3) determine the inhibitory activity of the distinctive compound of blue butterfly pea flower against *E. coli* ESBL that causes UTI in silico. This research is descriptive exploratory and experimental study. In vitro test used CRD with treatment groups consist of K1 (20%), K2 (30%), K3 (40%), K4 (50%), K+ (meropenem), K- (sterile aquadest). The antibacterial test was carried out by well diffusion and dilution method (MIC and MBC test). In silico test used molecular docking between *E. coli* ESBL receptor and blue butterfly pea flower active compound ligand. Pharmacokinetic characteristic, PASS, and binding affinity ( $\Delta G$ ) values were used as in silico parameters. Data analysis used ANOVA at 95% confidence level. The results showed that the highest total acid, pH, and total anthocyanin were found in K4 treatment (50%) with consecutive values 1.46475%, 2.585, dan 88,3955 mg/L. Antibacterial activity of blue butterfly pea flower kombucha was indicated by the presence of an inhibition zone with the highest value being 6,9 mm and the lowest value being 2 mm. The MIC value was obtained at a concentration of 40% and MBC test still showed bacterial colonies in all treatments. Molecular docking results show that clitorin and ternatin, a typical compound of blue butterfly pea flower has potential to inhibit ESBL.

Keywords: antibacterial, *E. coli* ESBL, in silico, in vitro, blue butterfly pea flower kombucha

نشاط مضاد بكتيريا كومبوتشا لزهرة تيلانج (*Clitoria ternatea L.*) زرقاء على بكتيريا الإشريكية القولونية ESBL في سبب التهاب مسالك البولية بواسطة *IN SILICO* و *IN VITRO*

منورة الحنيفة، بريليا ديوي فطرياساري، و محمد إمام الدين

### الملخص

أغلب العامل في التهاب مسالك البولية (UTI) هو الإشريكية القولونية. استخدام مضاد الحيوي على علاج التهاب مسالك البولية (UTI) إتساعاً يستطیع أن یسبب مقاومة *E. coli* مما أدى إلى طیف ممتد - ب لاكتاماز. (ESBL) أهداف البحث هو: (١) الأول، معرفة محتوى الحمضي الكلي، و درجة الحموضة، وإجمالي الأنثوسيانين في زهرة تيلانج زرقاء كومبوتشا (*Clitoria ternatea L.*) ؛ (٢) الثاني، معرفة نشاط مضاد البكتيريا و قيم KBM و KBM لزهرة تيلانج زرقاء كومبوتشا على الإشريكية القولونية ESBL *E. coli* ؛ (٣) الثالث، معرفة نشاط المثبط للمركب النشط لزهرة تيلانج زرقاء على الإشريكية القولونية ESBL التي تسبب التهاب مسالك البولية. *in silico*. هذا البحث يتصف بالبحث الوصفي الإكتشافي و التجريبي. استخدم الإختبار بشكل *in vitro* با RAL مع مجموعة المعالجة التي تتكون على K1 (٢٠٪)، K2 (٣٠٪)، K3 (٤٠٪)، K4 (٥٠٪)، K+ (Meropenem)، K- (ماء مقطر معقم). تم إجراء إختبار مضاد البكتيريا بطريقة انتشار البئر. بينما تم إجراء إختبار KBM و KHM بطريقة التخفيف. استخدم الإختبار بشكل *in silico* بطريقة الالتحام الجزيئي بين مستقبل *E. coli* ESBL و ligand للمركب النشط لزهرة تيلانج زرقاء. المواجهة *in silico* المستخدمة هي قيم الخصائص الدوائية و PASS والطاقة الحرة ( $\Delta G$ ). استخدم تحليل البيانات ANOVA بمستوى ثقة ٩٥٪. عرضت النتائج على أن مستويات الحموضة الكلية ودرجة الحموضة والأنثوسيانين الكلية وجدت في معاملة K4 (٥٠٪) (بقيم ١.٤٦٤٧٥٪ و ٢.٥٨٥ و ٨٨.٣٩٥٥ ملجم/لتر) على التوالي. أظهر نشاط مضاد بكتيريا كومبوتشا لزهرة تيلانج مع وجود منطقة تثبيط أعلى قيمة ٦.٩ مم وأقل قيمة ٢ مم. دلت نتائج إختبار KHM على الإيجابية بتركيز ٤٠٪ و لا تزال نتائج إختبار KBM على مستعمرات بكتيريا الحي في جميع العلاجات. دلت نتائج الالتحام الجزيئي على أن مركب كليتورين و ترنتين النموذجي في زهرة تيلانج زرقاء لديه القدرة على تثبيط الطيف الممتد- ب لاكتاماز. الكلمات الرئيسية: زهرة تيلانج كومبوتشا، الإشريكية القولونية ESBL، مضاد للجراثيم، *in vitro*

*in silico*

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Wr.Wb.*

*Bismillahirrohmaanirrohiim*, segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam karena atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “Aktivitas Antibakteri Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Biru Terhadap *Escherichia coli* Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Penyebab Infeksi Saluran Kemih secara *In Vitro* dan *In Silico*”. Tidak lupa pula shalawat dan salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW. yang telah menegakkan diinul Islam yang terpatri hingga akhirul zaman. Aamiin.

Berkat bimbingan dan dorongan dari berbagai pihak maka penulis mengucapkan terima kasih yang tak terkira khususnya kepada:

1. Prof. Dr. H. M Zainuddin, MA. selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prilya Dewi Fitriasaki, M.Sc. dan Dr. M. Imamuddin, Lc., M.A. selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan dalam meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.
5. Bayu Agung Prahardika, M.Si. selaku Dosen Wali yang telah membimbing dan memberikan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
6. Seluruh dosen dan laboran di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang setia menemani penulis dalam melakukan penelitian di laboratorium tersebut.
7. Imam Subandi, S.Si. selaku laboran Mikrobiologi dan Parasitologi Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, UIN Malang yang telah memberikan bantuan, arahan, dan masukan yang membangun kepada penulis.
8. Orangtua dan kakak tercinta yang telah memberikan doa, dukungan serta motivasi kepada penulis.
9. Teman-teman seperjuangan Program Studi Biologi

Semoga amal baik yang telah diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Skripsi ini sudah ditulis secara cermat dan sebaik-baiknya, namun apabila ada kekurangan, saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan.

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 7 Oktober 2022

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....</b>	<b>v</b>
<b>PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>المخلص .....</b>	<b>ix</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1    Latar Belakang .....	1
1.2    Rumusan Masalah.....	7
1.3    Tujuan Penelitian .....	7
1.4    Hipotesis .....	8
1.5    Manfaat Penelitian .....	8
1.6    Batasan Masalah .....	9
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>10</b>
2.1    Bunga Telang ( <i>Clitoria ternatea</i> L.) Biru.....	10
2.1.1    Klasifikasi Bunga Telang Biru.....	10
2.1.2    Morfologi Bunga Telang Biru.....	11
2.1.3    Manfaat dan Kandungan Bunga Telang Biru .....	12
2.2    Kombucha.....	14
2.2.1 <i>Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast</i> .....	16
2.2.2    Faktor-Faktor Pengaruh Fermentasi Kombucha .....	18
2.2.3    Manfaat dan Kandungan Kombucha.....	20
2.3    Antimikroba .....	24
2.4    Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.5    Infeksi Saluran Kemih .....	29
2.5.1    Klasifikasi ISK .....	30
2.5.2    Mikroorganisme Penyebab ISK .....	31
2.5.3    Patofisiologi ISK.....	32
2.6    Metode pH <i>Differential</i> .....	32
2.7    Titrasi .....	33
2.8    Uji <i>In Silico</i> Melalui Pendekatan <i>Molecular Docking</i> .....	34
2.8.1    Sumber Informasi <i>Database</i> .....	34
2.8.2    Perangkat Lunak ( <i>Software</i> ).....	35

<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>38</b>
3.1 Rancangan Penelitian.....	38
3.2 Waktu dan Tempat.....	38
3.3 Alat dan Bahan.....	39
3.3.1 Alat.....	39
3.3.2 Bahan.....	40
3.4 Variabel.....	40
3.5 Prosedur Penelitian .....	41
3.5.1 Pembuatan Kombucha Bunga Telang Biru.....	41
3.5.2 Analisis Kadar Total Asam Kombucha Bunga Telang Biru.....	41
3.5.3 Analisis pH Kombucha Bunga Telang Biru .....	43
3.5.4 Analisis Antosianin Total Kombucha Bunga Telang Biru .....	43
3.5.5 Uji Fitokimia Kombucha Bunga Telang Biru.....	44
3.5.6 Pembuatan Media.....	45
3.5.7 Peremajaan Biakan <i>Escherichia coli</i> ESBL.....	45
3.5.8 Pembuatan Inokulum <i>Escherichia coli</i> ESBL.....	46
3.5.9 Pengujian Konfirmasi <i>Escherichia coli</i> ESBL.....	46
3.5.10 Uji Aktivitas Antibakteri.....	48
3.5.11 Penentuan KHM dan KBM.....	49
3.5.12 Uji <i>In Silico</i> .....	50
3.6 Analisis Data.....	52
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>54</b>
4.1 Kadar Total Asam, pH, dan Antosianin Total Kombucha.....	54
4.2 Aktivitas Antibakteri Kombucha terhadap <i>E. coli</i> ESBL.....	57
4.2.1 Uji Aktivitas Antibakteri Kombucha terhadap <i>E. coli</i> ESBL.....	57
4.2.2 Uji KHM Kombucha terhadap <i>E. coli</i> ESBL.....	61
4.2.3 Uji KBM Kombucha terhadap <i>E. coli</i> ESBL.....	63
4.3 <i>In Silico</i> .....	65
4.3.1 Skrining Fitokimia Kombucha Bunga Telang Biru .....	65
4.3.2 Analisis Farmakokinetik Senyawa Bunga Telang Biru .....	67
4.3.3 Prediksi PASS ( <i>Prediction of Activity Spectra for Substances</i> ).....	68
4.3.4 <i>Molecular Docking</i> .....	70
4.4 Kajian Al Quran Terkait Hasil Penelitian.....	76
<b>BAB V PENUTUP.....</b>	<b>81</b>
5.1 Kesimpulan .....	81
5.2 Saran .....	81
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>82</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>89</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2. 1. Kandungan senyawa aktif bunga telang biru .....	13
2. 2. Mikroorganisme dalam kombucha .....	16
2. 3. Komponen utama kombucha .....	21
3. 1. Kategori zona hambat .....	48
4. 1. Nilai TAT, pH, dan antosianin total pada kombucha bunga telang biru .....	54
4. 2. Hasil uji KHM kombucha bunga telang terhadap <i>E. coli</i> ESBL .....	62
4. 3. Hasil uji KBM kombucha bunga telang terhadap <i>E. coli</i> ESBL.....	63
4. 4. Hasil skrining fitokimia kombucha bunga telang biru.....	65
4. 5. Karakter farmakokinetik senyawa aktif bunga telang biru .....	67
4. 6. Hasil prediksi PASS senyawa aktif bunga telang biru.....	69
4. 7. Tinjauan hasil <i>in silico</i> senyawa aktif bunga telang biru .....	75

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1. Morfologi bunga telang biru .....	12
2. 2. Metabolisme <i>symbiotic culture of bacteria and yeast</i> .....	18
2. 3. Mekanisme probiotik dalam merusak bakteri .....	22
2. 4. Mekanisme antosianin sebagai antibakteri .....	24
2. 5. SEM <i>Escherichia coli</i> .....	27
2. 6. Mikroorganisme penyebab ISK .....	31
4. 1. Korelasi konsentrasi gula pada kombucha terhadap zona hambat.....	57
4. 2. Zona hambat kombucha bunga telang biru terhadap <i>E. coli</i> ESBL.....	58
4. 3. <i>Total Plate Count</i> (TPC).....	64
4. 4. Nilai energi bebas ( $\Delta G$ ) hasil <i>molecular docking</i> .....	71
4. 5. Visualisasi interaksi antara ligan dengan reseptor .....	72

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian .....	89
Lampiran 2. Rumus Perhitungan .....	90
Lampiran 3. Data Hasil Analisis Total Asam .....	96
Lampiran 4. Data Hasil Analisis Nilai pH .....	96
Lampiran 5. Data Hasil Analisis Kadar Antosianin Total .....	97
Lampiran 6. Data Diameter Zona Hambat .....	97
Lampiran 7. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum .....	97
Lampiran 8. Data Jumlah Koloni Bakteri <i>E. coli</i> ESBL .....	98
Lampiran 9. Hasil Uji Normalitas .....	98
Lampiran 10. Hasil Uji Homogenitas .....	99
Lampiran 11. Hasil Uji ANOVA .....	100
Lampiran 12. Hasil Uji BNT .....	101
Lampiran 13. Hasil Uji Kruskal Wallis Data Zona Hambat .....	103
Lampiran 14. Hasil Uji Fitokimia .....	103
Lampiran 15. Hasil Konfirmasi <i>E. coli</i> ESBL .....	104
Lampiran 16. Gambar Hasil Aktivitas Antibakteri .....	105
Lampiran 17. Gambar Hasil Uji KHM .....	106
Lampiran 18. Gambar Hasil Uji KBM .....	106
Lampiran 19. Struktur Ligan .....	107
Lampiran 20. Struktur Reseptor .....	108
Lampiran 21. Data Nilai Energi Bebas ( $\Delta G$ ) Ligan – Reseptor .....	109
Lampiran 22. Gambar Dokumentasi Penelitian .....	110
Lampiran 23. Kartu Konsultasi Skripsi .....	113
Lampiran 24. Form Checklist Plagiasi .....	115



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme pada traktus urinarius dan termasuk penyakit infeksi yang paling banyak terjadi kedua setelah penyakit infeksi pernapasan. ISK termasuk jenis infeksi nosokomial paling umum yang menyebabkan sekitar 40% dari seluruh kasus infeksi per tahun. Jumlah kasus ISK pada tahun 2019 mencapai 404,6 juta di seluruh dunia dan mengalami peningkatan sebanyak 152,4 juta kasus dari tahun sebelumnya (Zeng *et al.*, 2022).

Pengobatan lini pertama ISK yaitu dengan menggunakan antibiotik seperti nitrofurantoin dan fluorokuinolon (siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin). Terdapat beberapa antibiotik yang digunakan dalam pengobatan ISK yang disebabkan oleh bakteri gram negatif yaitu kelompok  $\beta$ -laktam seperti ampisilin, dan aztreonam (Suwanto, 2014). Penggunaan antibiotik secara luas dan terus menerus dapat menyebabkan efek samping seperti reaksi alergi hingga efek sistemik pada gastrointestinal.

Penggunaan antibiotik secara luas juga dapat menyebabkan resistensi bakteri terhadap antibiotik tertentu sehingga penderita ISK tidak membaik setelah diberi antibiotik dan pengobatan menjadi tidak efektif. Salah satu bentuk resistensi bakteri yaitu adanya *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase* (ESBL). ESBL merupakan enzim yang dapat menghidrolisis antimikroba golongan  $\beta$ -laktam. Ikatan Ahli Urologi Indonesia (2020) menyatakan bahwa antibiotik lini pertama pengobatan ISK yaitu ampisilin dan aztreonam memiliki

tingkat resistensi sebesar 89% dan 53%. Penelitian Yadav & Prakash (2017) menyebutkan bahwa *E. coli* ESBL menunjukkan resistivitas tertinggi pada 5 dari 12 antibiotik yaitu sefalekssin sebesar 78,86%, asam nalidiksik sebesar 73,98%, kotrimoksazol sebesar 71,54%, ceftioxone sebesar 67,47%, dan ceftazidime sebesar 63,41%. Banyaknya kasus resistensi terhadap pengobatan ISK menggunakan antibiotik menyebabkan pilihan antibiotik sebagai agen terapeutik ISK berkurang dan menjadi sangat terbatas sehingga diperlukan pengobatan alternatif lainnya. Hadis Nabi Muhammad SAW. dari Abu Hurairah Ra. menjelaskan sebagai berikut:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: “Tidaklah Allah menurunkan penyakit, melainkan Dia pula yang menurunkan obatnya” (HR. Al-Bukhari No. 5246)

Hadis tersebut menjelaskan bahwa Allah menciptakan obat dari setiap penyakit yang dirunkan-Nya. Rasulullah SAW. pada hadis tersebut menegaskan bahwa obat dari suatu penyakit ada dengan usaha manusia dalam menemukannya seperti dengan melakukan penelitian medis (Al-Kaheel, 2012). Begitu juga dengan kasus resistensi antibiotik golongan  $\beta$ -laktam pada ISK, perlu dilakukan penelitian tentang pencarian pengobatan alternatif lain dalam mengatasi permasalahan tersebut. Salah satu pilihan pengobatan alternatif ISK yang dapat digunakan yaitu dengan menggali potensi antibakteri dari minuman probiotik seperti kombucha.

Minuman kombucha terbuat dari teh manis yang difermentasi oleh asosiasi mikroba bakteri dan khamir yang juga dikenal sebagai SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Aktivitas mikroorganisme selama proses

fermentasi menghasilkan beberapa jenis asam organik, vitamin, dan lapisan selulosa yang terdapat di permukaan atas kombucha. Fermentasi kombucha menghasilkan asam asetat yang berpotensi mencegah pertumbuhan bakteri gram negatif maupun gram positif. Khamir dalam kombucha akan merombak sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa serta menghasilkan etanol dari glukosa. Glukosa hasil konversi oleh khamir diubah menjadi asam asetat sebagai produk akhir. Selain sebagai produk akhir, asam asetat bertindak sebagai stimulan bagi khamir untuk menghasilkan etanol lebih banyak untuk diubah menjadi asam asetat dengan bantuan *aldehyde dehydrogenase* sehingga produk akhir yang dihasilkan lebih banyak (Laavanya *et al.*, 2021). Hal ini menjadi salah satu kelebihan kombucha dari minuman probiotik lainnya. Berbagai proses tersebut tidak akan tercapai tanpa adanya simbiosis antara bakteri dan khamir yang termasuk mikroorganisme. Penggambaran mikroorganisme atau makhluk hidup yang memiliki ukuran sangat kecil secara implisit ditemukan dalam Al-Qur'an Surat Yunus [10]:61 yang berbunyi:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ

Artinya: “Dan tidakkah engkau (Muhammad) berada dalam suatu urusan, dan tidak membaca suatu ayat Al-quran serta tidak pula kamu melakukan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu ketika kamu melakukannya. Tidak lengah sedikitpun dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarrah, baik di bumi ataupun di langit. Tidak ada sesuatu yang lebih kecil dan yang lebih besar daripada itu, melainkan semua tercatat dalam Kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)”

Ayat diatas menjelaskan secara eksplisit bahwa Allah SWT menjadi saksi dan mengawasi terhadap semua perbuatan hamba-Nya baik gerak maupun diamnya, baik besar maupun kecil. Tidak ada sesuatu yang terlewatkan dari pengetahuan-Nya walaupun sebesar *zarrah* yang ada di muka bumi maupun di langit. Menurut tafsir Ibnu Katsir dalam Bahreisy (1988) ayat tersebut menyatakan bahwa Allah SWT. mengetahui semua sepaik terjang seluruh makhluk-Nya pada tiap detik, menit, dan detiknya. Tidak terdapat sesuatu yang luput dari pengetahuan-Nya walaupun sebesar atom baik yang terdapat di langit maupun di bumi. Lafadz ذَرَّةٌ pada ayat tersebut secara definisi berarti sesuatu yang memiliki ukuran sangat kecil. Pada tafsir Ibnu Katsir lafadz ذَرَّةٌ dipahami sebagai atom yang dikenal dengan partikel terkecil yang terdapat di dalam semesta.

Tafsir Al-Maraghi (1993) menyebutkan bahwa lafadz ذَرَّةٌ pada surah Yunus ayat 61 didefinisikan sebagai tubuh yang paling kecil. Sedangkan menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Mishbah lafadz ذَرَّةٌ dipahami dalam berbagai arti seperti semut yang sangat kecil, kepala semut, dan debu yang berterbangan yang terlihat di celah matahari. Lafadz ذَرَّةٌ mempunyai makna yang berbeda-beda tetapi mempunyai esensi yang sama yaitu suatu hal terkecil yang terdapat di dunia ini. Jika dilihat dari sudut pandang ilmu hayat, lafadz ذَرَّةٌ dapat diartikan sebagai makhluk hidup yang memiliki ukuran sangat kecil seperti bakteri.

Bahan kombucha pada umumnya menggunakan teh, namun tidak menutup kemungkinan juga dapat menggunakan berbagai macam bahan seperti bunga telang biru (*Clitoria ternatea* L.). Ekstrak bunga telang biru memiliki aktivitas farmakologis seperti antipiretik, antiinflamasi, analgesik, diuretik, antidiabetik, anestesi lokal, insektisida, dan antimikroba (Zhang *et al.*, 2021). Aktivitas

antimikroba pada beberapa bagian tumbuhan *C. ternatea* L. diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang dapat menyebabkan beberapa infeksi seperti infeksi saluran kemih. Ekstrak etanol dan metanol daun bunga telang biru dengan konsentrasi 50% diketahui dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* ESBL yang dapat menyebabkan penyakit infeksi saluran kemih, sepsis, infeksi saluran pernapasan, dan meningitis dengan zona hambat secara berturut-turut sebesar 7,4 dan 7,8 mm (Rahmawati *et al.*, 2021).

Bunga telang biru memiliki senyawa aktif khas golongan antosianin seperti ternatin yang tidak dimiliki tumbuhan lain dan diketahui dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat-obatan atau nutrasetikal untuk penyakit inflamasi kronis (Buchori *et al.*, 2017). Ternatin juga memiliki aktivitas farmakologis seperti antibakteri dengan merusak membran sehingga menyebabkan kebocoran asam nukleat bakteri patogen. Penelitian Sun *et al.* (2018) menyebutkan bahwa pemberian antosianin selama 2 jam menyebabkan peningkatan jumlah asam nukleat yang keluar dari sel bakteri *E. coli* sebesar 54.1% dengan perbandingan kontrol tidak terdapat asam nukleat yang terdeteksi.

Pemanfaatan kombucha bunga telang biru dapat digunakan sebagai salah satu pilihan pengobatan alternatif ISK. Penelitian yang dilakukan oleh Rezaldi *et al.* (2021) menunjukkan bahwa kombucha bunga telang biru dengan konsentrasi gula 40% memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dengan zona hambat sebesar 6 mm yang termasuk dalam kategori sedang. Penambahan gula pada penelitian tersebut bertujuan sebagai sumber energi bagi mikroba starter kombucha. Penambahan konsentrasi gula dapat mendukung tingkat pertumbuhan yang lebih cepat sehingga produk metabolit yang dihasilkan juga semakin banyak.

Konsentrasi gula yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 20%, 30%, 40%, dan 50% (b/v). Penggunaan interval 10 pada penambahan konsentrasi gula dikarenakan aktivitas antibakteri yang dihasilkan lebih berbeda signifikan daripada penggunaan interval 5. Penelitian Rezaldi *et al.* (2022) menyatakan bahwa aktivitas antibakteri kombucha dengan konsentrasi gula 20% tidak berbeda signifikan dengan kombucha konsentrasi gula 15%. Penelitian ini juga dilakukan pengukuran total asam dan pH untuk mengetahui kombucha bunga telang biru yang dihasilkan sesuai dengan standar konsumsi minuman kombucha. Selain itu, juga diukur antosianin total kombucha untuk mengetahui hubungan antara antosianin total dari berbagai perlakuan konsentrasi gula kombucha dengan aktivitas antibakteri yang dihasilkan.

Pemanfaatan senyawa aktif bunga telang biru dapat digunakan sebagai bahan obat terapeutik ISK dengan dikembangkan melalui desain obat sebagai obat antibakteri. Desain obat sering digambarkan sebagai proses elaborasi yang sistematis untuk mengembangkan lebih lanjut obat yang sudah ada dengan tujuan untuk mendapatkan obat baru dengan aktivitas yang lebih baik secara *in silico* (Yuan *et al.*, 2017).

Uji *in silico* pada penelitian ini digunakan sebagai konfirmasi dari uji *in vitro* yang dilakukan mengenai potensi penghambatan bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL. Parameter yang digunakan dalam uji *in silico* yaitu karakter farmakokinetik, nilai uji PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) senyawa aktif bunga telang biru, serta nilai energi bebas (*binding affinity*) dan *binding pose* dari hasil interaksi senyawa aktif bunga telang biru dengan *E. coli* ESBL.

Latar belakang di atas menjelaskan potensi-potensi bunga telang biru yang bermanfaat bagi tubuh manusia. Disamping kemampuan antibakterinya, penelitian tentang pemanfaatan kombucha bunga telang biru sebagai antibakteri yang dilakukan secara *in vitro* juga masih sedikit dilakukan. Selain uji aktivitas antibakteri juga dilakukan uji *in silico* untuk mengetahui potensi senyawa aktif bunga telang biru dalam menghambat *E. coli* ESBL.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah dipaparkan, maka rumusan masalah yang diangkat adalah:

1. Berapa kadar total asam, pH, dan antosianin total pada kombucha bunga telang (*C. ternatea* L.) biru dengan penambahan konsentrasi gula yang berbeda?
2. Apakah kombucha bunga telang (*C. ternatea* L.) biru memiliki aktivitas antibakteri serta berapa nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap bakteri *E. coli* ESBL?
3. Apakah senyawa khas bunga telang (*C. ternatea* L.) biru memiliki potensi dalam menghambat *E. coli* ESBL penyebab penyakit ISK secara *in silico*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kadar total asam, pH, dan antosianin total pada kombucha bunga telang (*C. ternatea* L.) biru dengan penambahan konsentrasi gula yang berbeda.

2. Mengetahui aktivitas antibakteri serta nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) kombucha bunga telang (*C. ternatea* L.) biru terhadap bakteri *E. coli* ESBL.
3. Mengetahui potensi senyawa khas bunga telang (*C. ternatea* L.) biru dalam menghambat *E. coli* ESBL penyebab penyakit ISK secara *in silico*.

#### 1.4 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini antara lain:

1. Adanya kadar total asam, pH, dan antosianin total pada kombucha bunga telang (*C. ternatea* L.) biru dengan penambahan konsentrasi gula yang berbeda.
2. Adanya aktivitas antibakteri, KHM, dan KBM kombucha bunga telang (*C. ternatea* L.) biru terhadap bakteri *E. coli* ESBL.
3. Adanya potensi senyawa khas bunga telang (*C. ternatea* L.) biru dalam menghambat *E. coli* ESBL penyebab penyakit ISK.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat dihasilkan dari penelitian ini adalah:

1. Sumber referensi bidang pangan dan kesehatan mengenai efektivitas kombucha bunga telang (*C. ternatea* L.) biru sebagai antibakteri sehingga dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif antibakteri yang berasal dari produk pangan.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang senyawa aktif bunga telang (*C. ternatea* L.) biru yang memiliki potensi dalam menghambat *E. coli* ESBL (PDB ID: 6NVU) penyebab penyakit ISK.



3. Memberikan informasi dalam dunia kesehatan mengenai senyawa aktif dari bunga telang (*C. ternatea* L.) biru yang dapat dijadikan sebagai bahan baku dalam pengembangan obat baru untuk penyakit ISK.

### 1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini antara lain:

1. Bahan kombucha yang digunakan yaitu bunga telang (*C. ternatea* L.) biru kering.
2. Bakteri uji yang digunakan yaitu *E. coli* ESBL yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya.
3. Konsentrasi gula kombucha yang digunakan yaitu 20%, 30%, 40%, 50% (b/v).
4. Senyawa aktif bunga telang (*C. ternatea* L.) biru yang digunakan dalam uji *in silico* adalah cephalotaxine, clitorin, ternatin, dan quercetin 3-(6"-malonylneohesperidoside).
5. Reseptor yang digunakan adalah *E. coli* ESBL PDB ID: 6NVU yang diunduh dari PDB <http://www.rcsb.org>.
6. Parameter uji *in silico* adalah karakter farmakokinetik senyawa aktif bunga telang biru, nilai uji PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) senyawa aktif bunga telang biru, nilai energi bebas (*binding affinity*) dan *binding pose* dari hasil interaksi senyawa aktif (ligan) dengan reseptor *E. coli* ESBL.
7. *Software* yang digunakan dalam uji *in silico* yaitu SwissADME, *Discovery Studio*, *PASS Prediction*, *PyMOL*, dan *PyRx AutoDock Vina*. *Database* yang digunakan yaitu *PubChem* dan *Protein Data Bank*.

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Biru**

#### **2.1.1 Klasifikasi Bunga Telang Biru**

*Clitoria ternatea* L. umumnya dikenal sebagai bunga telang termasuk dalam tanaman herba perennial dari famili Fabaceae. Berbagai nama *C. ternatea* L. seperti *butterfly pea*, *blue-pea*, *bluebellvine*, *cordofan-pea* (Inggris), *mazerion hidi*, *baslat el-zuhoor* (Arab), *die dou* (Cina), *honte* (Perancis), *blaue klitorie* (Jerman), *zapotillo*, *azulejo* (Spanyol), bunga telang (Indonesia). Bunga telang memiliki berbagai macam warna seperti warna pink, putih, ungu, hingga biru. Baru-baru ini bunga telang biru menarik banyak minat karena memiliki aplikasi potensial baik dalam pengobatan modern dan pertanian, sebagai sumber pewarna makanan alami dan antioksidan. Bunga telang biru dapat tumbuh di daerah tropis seperti benua Asia, dan memiliki persebaran hingga Amerika Selatan, Amerika Utara, Afrika, Brazil, dan Pasifik Utara. Klasifikasi *C. ternatea* L. menurut Cooper (2014) yaitu:

Kingdom : Plantae  
Division : Magnoliophyta  
Class : Magnoliopsida  
Subclass : Rosidae  
Order : Fabales  
Family : Fabaceae  
Genus : *Clitoria* L.  
Species : *Clitoria ternatea* L.

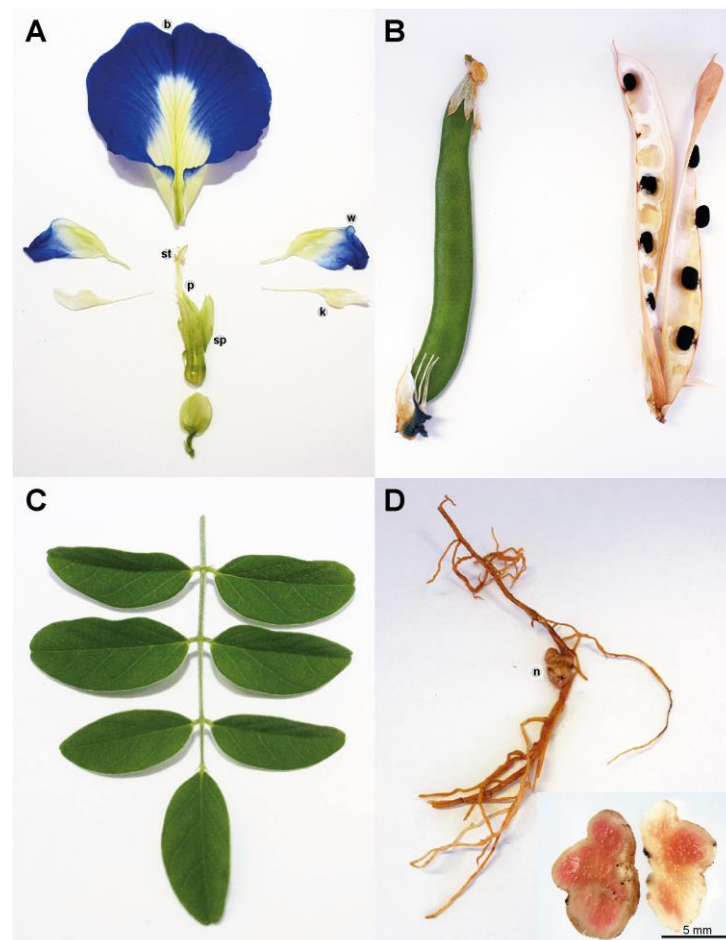
### 2.1.2 Morfologi Bunga Telang Biru

*C. ternatea* L. biru memiliki simetri bunga setangkup tegak (*pentamerous zygomorphic*) dengan kelopak (*calyx*) berbentuk tabung yang terdiri dari lima sepal yang menyatu sekitar dua pertiga dari panjangnya. Mahkota (*corollae*) bunga telang yang mencolok terdiri dari lima petal dengan warna biru tua. Benang sari (*stamen*) bunga telang biru memiliki tipe perlekatan tangkai sari (*filament*) *diadelphous* yaitu benang sari berbekas dua atau bertungkal dua, terbagi menjadi dua kelompok dengan sembilan *filament* menyatu dan satu terletak bebas. Kepala sari (*anther*) berwarna putih melekat pada setiap *filament* yang memiliki empat lobus dan mengandung serbuk sari. Putik bunga telang biru memiliki bakal buah (*ovary*) yang menghasilkan 10 bakal biji (*ovules*). Bunga telang biru memiliki polong yang kecil dan pipih dengan ujung runcing berisi sekitar 10 biji.

Daun bunga telang biru termasuk dalam tipe daun majemuk menyirip (*pinnatus*) dengan bentuk daun *obovate* yaitu berbentuk seperti telur dan menyempit pada bagian pangkal daun (Gambar 2.1). Epidermis pada kedua permukaan daun terdiri dari satu lapisan sel yang dilindungi oleh kutikula yang tebal dan pertumbuhan trikoma. *C. ternatea* L. memiliki akar tunggang dan menghasilkan sistem akar yang ekstensif sehingga dapat memungkinkan tumbuhan dapat bertahan hingga 7-8 bulan kekeringan. Akar bunga telang biru memiliki bintil akar yang besar untuk fiksasi nitrogen.

Perkecambahan bunga telang biru paling baik pada suhu antara 24-32°C dengan penaburan benih di tanah lembab pada kedalaman 2,5-5 cm dan jarak 20-30 cm. Meskipun bunga telang biru dapat bertahan dalam kondisi kering, tanaman tumbuh paling baik dengan kelembaban dan curah hujan yang cukup (650-1250

mm) dan ketika suhu mencapai 27°C atau lebih tinggi. Bunga telang biru rentan terhadap kerusakan akibat embun beku, sama seperti kebanyakan legum tropis. Namun, bunga telang biru dapat mempertahankan daunnya selama 7 hari.



**Gambar 2. 1. Morfologi Bunga Telang Biru (A) bunga (B) polong (C) daun (D) akar dan bintil akar (Oguis *et al.*, 2019)**

### 2.1.3 Manfaat dan Kandungan Bunga Telang Biru

*C. ternatea* L. biru memiliki kandungan fitokimia seperti tanin, phlobatannin, karbohidrat, saponin, triterpenoid, fenol, flavonoid, glikosida flavonol, protein, alkaloid, antrakuinon, antosianin, minyak folatil dan steroid (Tabel 2.1). Kandungan asam lemak biji bunga telang biru meliputi asam palmitat,

stearat, oleat, linoleat, dan linolenat. Biji bunga telang biru juga mengandung asam sinamat, glukosida antosantin, finotin, delphinidin dan beta-sitosterol (Ali, 2016).

**Tabel 2. 1. Kandungan senyawa aktif Bunga Telang Biru**

<b>Senyawa Aktif</b>	<b>Konsentrasi (nmol/mg)</b>
Antosianin	14.66 ± 0.33
Flavonoid	20.07 ± 0.55
Flavonol glikosida	12.71 ± 0.46
Kaempferol glikosida	5.40 ± 0.23
Mirisetin glikosida	0.04 ± 0.01
Quersetin glikosida	1.92 ± 0.12

Anthika *et al.* (2015)

Ekstrak akar dan daun *C. ternatea* L. biru menunjukkan aktivitas anti inflamasi, analgesik, dan antipiretik. Pemberian ekstrak akar metanol dan ekstrak bunga etanol telang biru secara oral secara signifikan dapat menghambat edema kaki tikus yang diinduksi karagenin dan permeabilitas vaskular yang diinduksi asam asetat pada tikus (Singh *et al.*, 2018). Ekstrak bunga telang biru memiliki aktivitas farmakologis seperti antipiretik, antiinflamasi, analgesik, diuretik, insektisida, antidiabetik, anestesi lokal, dan antimikroba.

Ekstrak air, metanol, dan kloroform dari bunga telang biru diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap ESBL yang diproduksi oleh *E. coli* uropatogenik, *E. coli* enterotoksigenik, *E. coli* enteropatogenik, *Klebsiella pneumoniae*, dan *pseudomonas aeruginosa*. Penelitian Uma *et al.* (2009) menunjukkan bahwa ekstrak metanol bunga telang biru menunjukkan aktivitas penghambatan yang relatif tinggi terhadap ESBL yang diproduksi oleh *E. coli* uropatogenik, *E. coli* enterotoksigenik, *E. coli* enteropatogenik dibandingkan dengan kloroform dan ekstrak air. Aktivitas penghambatan tersebut ditunjukkan

dengan adanya zona hambat yang dihasilkan ekstrak metanol pada konsentrasi 4 mg/disc dengan nilai 20 mm pada UPEC, 16 mm pada ETEC dan EPEC. Nilai KHM menunjukkan 1.25 mg/ml pada UPEC, 2.5 mg/ml pada ETEC dan EPEC. Nilai KBM menunjukkan 0.625 mg/ml pada UPEC, 1.25 mg/ml pada ETEC dan EPEC. Studi tersebut mengungkapkan bahwa ekstrak bunga telang biru efektif menghambat bakteri *E. coli* ekstraintestinal khususnya UPEC yang dapat menyebabkan penyakit ISK daripada bakteri patogen enterik.

## 2.2 Kombucha

Kombucha adalah minuman fermentasi asal Asia, tetapi telah mendapatkan popularitas di Eropa karena efek terapeutiknya seperti antimikroba, antioksidan, antikarsinogenik, antidiabetes, pengobatan tukak lambung, dan kolestrol tinggi. Kombucha juga menunjukkan dampak pada respon imun dan detoksifikasi hati. Minuman tradisional ini awalnya dibuat dari fermentasi teh hitam manis (*Camellia sinensis*). Fermentasi teh adalah produk dari koloni simbiosis bakteri dan khamir yang terdapat dalam film selulosa. Lapisan selulosa ini disebut sebagai SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) yang dikenal dengan jamur teh atau induk kombucha (De Filippis *et al.*, 2018). Allah SWT. berfirman dalam Al-Qur'an Surat Yasin [36]: 34-35 sebagai berikut:

وَجَعَلْنَا فِيهَا جَنَّاتٍ مِنْ نَخِيلٍ وَأَعْنَابٍ وَفَجَّرْنَا فِيهَا مِنَ الْعُيُونِ (٣٤) لِيَأْكُلُوا مِنْ ثَمَرِهِ وَمَا عَمِلَتْهُ أَيْدِيهِمْ أَفَلَا يَشْكُرُونَ (٣٥)

Artinya: “Dan Kami jadikan padanya kebun-kebun kurma dan anggur dan Kami pancarkan kepadanya beberapa mata air. Supaya mereka dapat makan dari buahnya dan dari apa yang diusahakan oleh tangan mereka. Maka mengapakah mereka tidak bersyukur?”

Menurut As-Sa'di (2015) dalam tafsirnya, maksud dari “dan kami jadikan padanya” pada ayat tersebut berarti bumi atau tanah yang kering. Kebun-kebun berarti kebun yang penuh pepohonan terutama pohon kurma dan anggur. Kemudian Allah memancarkan mata air yang mengalir menjadi sungai-sungai yang sangat berguna bagi kehidupan di bumi. Allah menciptakan semua hal tersebut agar manusia dapat makan dari buahnya dan menikmati dari hasil usaha tangan mereka. Kata ما pada lafadz وَمَا عَمِلَتْهُ أَيْدِيهِمْ menurut Asy-Syaukani (2011) dalam tafsir *Fathul Qadir* didefinisikan sebagai “oleh” sehingga makna dari ayat tersebut yaitu supaya manusia dapat mengonsumsi buah dari kebun-kebun tersebut dan dari apa yang diusahakan oleh tangan mereka seperti sari kurma, sari buah, dan lain-lain.

Menurut Shihab (2009) dalam tafsir Al-Misbah Kata ما pada وَمَا عَمِلَتْهُ أَيْدِيهِمْ memiliki beberapa arti yaitu “apa” seperti pada terjemahan terjemahan ayat dan dapat berarti “bukan” sehingga makna dari ayat tersebut yaitu semua itu bukanlah hasil usaha tangan mereka. Selain itu, juga dapat diartikan sebagai “yang” sehingga makna dari ayat diatas yaitu supaya mereka dapat makan dari buah yang diusahakan oleh tangan mereka. Makna ketiga dipahami sebagai arti hasil olahan manusia terhadap buah-buahan tersebut seperti sari buah, jus buah, hingga asinan buah. Ayat tersebut secara implisit menjelaskan bahwa terdapat tumbuhan yang dapat diolah sedemikian rupa untuk dijadikan bahan pangan yang lebih bermanfaat dan memiliki nilai gizi yang lebih tinggi. Seperti halnya, bunga telang biru yang dapat diolah menjadi minuman kombucha melalui proses fermentasi dengan penambahan SCOBY sehingga memiliki nilai gizi dan manfaat yang lebih tinggi.

### 2.2.1 *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*

Kultur kombucha atau SCOBY adalah biofilm yang diperoleh dari asosiasi simbiosis antara bakteri dan khamir yang juga disebut “teh jamur” karena terlihat seperti karpet jamur ketika tumbuh dalam kondisi statis. SCOBY adalah nama umum yang diberikan untuk film agar-agar selulosa yang terbentuk di permukaan teh dan berfungsi melakukan fermentasi untuk memperoleh kombucha. SCOBY juga dikenal sebagai “ibu kombucha” karena akan menghasilkan minuman dan film selulosa baru. Film-film tersebut terbentuk berlapis-lapis dengan lapisan yang paling dekat dengan permukaan merupakan lapisan terbaru (Coelho *et al.*, 2020).

Pertumbuhan konsorsium bakteri dan khamir menginduksi membran baru yang lebih tebal yang berbentuk wadah tempat fermentasi dilakukan dan meningkatkan efek simbiosis antara bakteri dan khamir. SCOBY menjaga bakteri asetat di permukaan sehingga bakteri memiliki cukup oksigen untuk pertumbuhan, serta merealisasikan fermentasi anaerobik pada khamir karena khamir ditempatkan di bagian bawah film. Komposisi mikrobiologis dapat bervariasi (Tabel 2.2) berdasarkan pada beberapa faktor seperti asal, iklim, lokasi geografis, dan media fermentasi. Genus bakteri yang mendominasi dalam kultur simbiosis yaitu *Acetobacter* dan *Gluconobacter* (Coelho *et al.*, 2020).

**Tabel 2. 2. Mikroorganisme dalam kombucha**

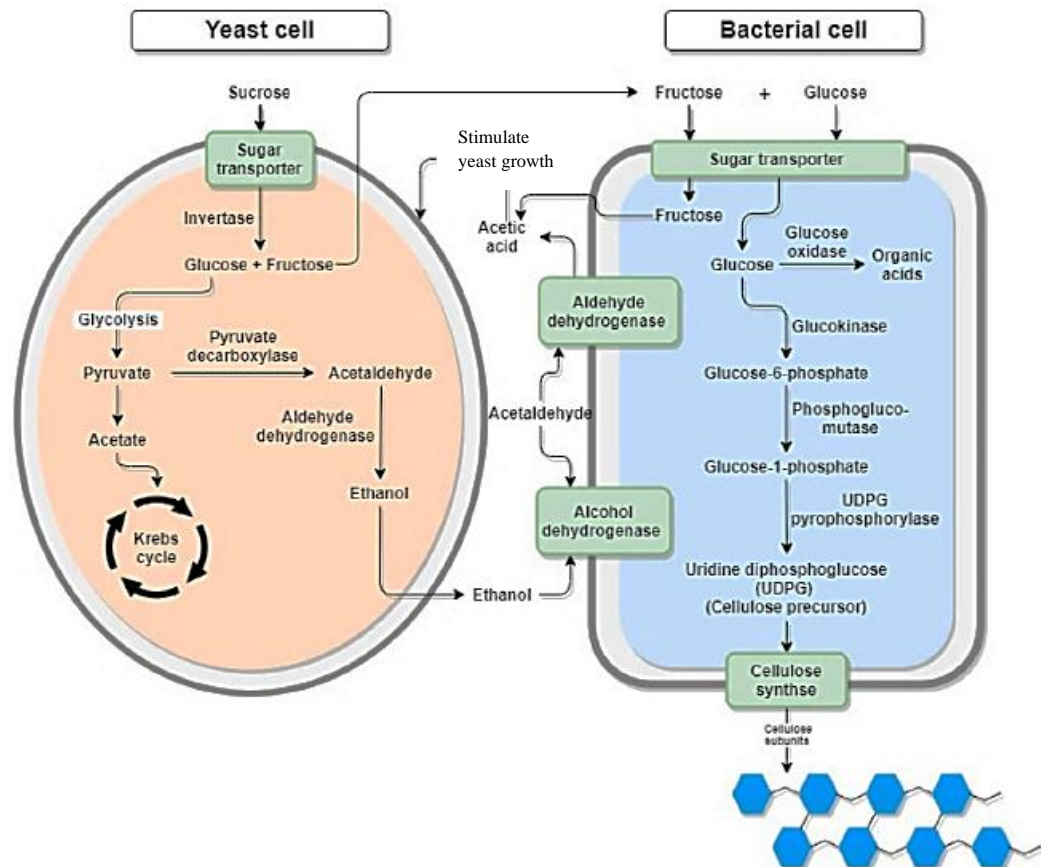
<b>Bakteri</b>	<b>Khamir</b>
<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>Acetobacter acetic</i> , <i>Bacterium gluconicum</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Torula</i> spp., <i>Torulopsis</i> spp., <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Mycoderma</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp.
<i>Acetobacter intermedius</i> , <i>Acetobacter nitrogenifigens</i> , <i>Gluconacetobacter kombucha</i>	<i>Pichia membranefaciens</i> , <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces</i> spp.

Coelho *et al.* (2020)



Mikroorganisme yang mendominasi dalam proses fermentasi kombucha yaitu khamir *Saccharomyces cerevisiae* dan bakteri *Acetobacter* spp. serta *Gluconobacter oxydans*. Proses fermentasi kombucha, khamir (*S. cerevisiae*) merombak sukrosa pada medium fermentasi menjadi fruktosa dan glukosa dengan menggunakan enzim invertase. Molekul glukosa menjadi substrat bagi bakteri (*G. oxydans* dan *A. intermedius*) untuk menghasilkan asam organik seperti asam asetat, glukonat, glukuronat dan lainnya sebagai hasil oksidasi oleh glukosa oksidase dan molekul fruktosa diubah menjadi asam asetat (Laavanya *et al.*, 2021).

Asam asetat yang dihasilkan bertindak sebagai stimulan bagi khamir untuk menghasilkan lebih banyak etanol yang kemudian diubah menjadi asam asetat dengan bantuan enzim *aldehyde dehydrogenase* oleh bakteri. Proses ini menimbulkan akumulasi etanol dan asam asetat yang lebih banyak pada kombucha. Bakteri *A. xylinum* juga termasuk sebagai bakteri dominan dalam kombucha yang mensintesis glukosa menjadi polisakarida yang akan membentuk selulosa sehingga menjadi lapisan nata (Gambar 2.2). Mekanisme biosintesis selulosa yaitu dengan merombak glukosa menjadi glukosa 6 fosfat yang kemudian menggunakan enzim fosfoglukomutase diubah menjadi glukosa 1 fosfat, diikuti dengan katalisis oleh uridin difosfat (UDP)-glukosa pirofosforilase untuk membentuk molekul UDP glukosa. UDP glukosa merupakan prekursor molekul selulosa, dengan bantuan enzim selulosa sintase dapat menghasilkan penambahan lebih banyak UDP glukosa untuk membentuk rantai polimer.



**Gambar 2. 2. Metabolisme *symbiotic culture of bacteria and yeast* (Laavanya et al., 2021)**

### 2.2.2 Faktor-Faktor Pengaruh Fermentasi Kombucha

Fermentasi dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti suhu, pH, oksigen, CO<sub>2</sub> terlarut serta sifat dan komposisi media. Setiap variasi dalam faktor-faktor tersebut dapat mempengaruhi laju fermentasi, spektrum, kinerja, sifat organoleptik, kualitas nutrisi, dan sifat fisikokimia produk. Varietas tanaman yang berbeda, konsentrasi gula, waktu fermentasi, dan komposisi SCOBY menjelaskan perbedaan komposisi dan aktivitas biologi.

#### 1. Substrat

Pada umumnya minuman kombucha diperoleh dari fermentasi teh hijau atau teh hitam manis. Beberapa dekade terakhir substrat yang digunakan pada

kombucha mulai bervariasi. Penggunaan jus anggur sebagai substrat kombucha yang difermentasi selama 6 hari memiliki peningkatan karakteristik nutrisi dan mengurangi produksi senyawa yang tidak diinginkan seperti asam organik yang memberikan rasa cuka pada minuman (Ayed *et al.*, 2016). Penggunaan substrat yang berbeda juga akan menghasilkan potensi terapeutik yang berbeda pula.

## 2. Waktu

Fermentasi kombucha pada umumnya berkisar antara 7 hingga 60 hari dan aktivitas biologinya dapat meningkat selama proses tersebut, tetapi hasil terbaik fermentasi kombucha diperoleh dalam rata-rata 15 hari. Meskipun sebagian besar aktivitas antioksidan yang diperoleh meningkat seiring dengan waktu inkubasi, fermentasi berkepanjangan tidak dianjurkan karena akumulasi asam organik yang meningkat dan dapat mencapai tingkat yang merusak untuk dikonsumsi langsung. Menurut *Food and Drug Administration Model Food Code* dalam Nummer (2013) pembuatan kombucha dengan fermentasi tidak lebih dari 15 hari direkomendasikan jika diproduksi untuk konsumsi manusia.

## 3. Temperatur

Mempertahankan suhu optimum selama fermentasi dapat menghasilkan pertumbuhan mikroba dan aktivitas enzim yang lebih baik. Umumnya suhu fermentasi kombucha berkisar antara 22-30°C. Jumlah asam, metabolit, dan vitamin memiliki hasil lebih besar pada suhu yang optimum.

## 4. pH

pH adalah salah satu parameter lingkungan terpenting yang mempengaruhi fermentasi kombucha, karena beberapa asam yang terbentuk sebagai asetat dan glukonat dapat bertanggung jawab atas aktivitas biologis minuman yang

dihasilkan. Hal ini juga erat kaitannya dengan pertumbuhan mikroba dan perubahan struktur senyawa fitokimia yang dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan. Nilai pH terendah yang dapat diterima dalam proses fermentasi kombucha yaitu tidak kurang dari 2,5. Proses mendapatkan minuman asam yang enak, fermentasi harus diakhiri ketika keasaman total mencapai nilai optimum (Saponjac & Vulic, 2014).

### **2.2.3 Manfaat dan Kandungan Kombucha**

Berbagai manfaat bagi kesehatan manusia dikaitkan dengan kombucha seperti mencegah kanker, meningkatkan kekebalan, meredakan peradangan dan artritis, serta bersifat antimikroba. Kombucha dilaporkan memiliki memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen gram positif dan gram negatif. Beberapa studi menunjukkan bahwa kombucha memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, dan *Escherichia coli*.

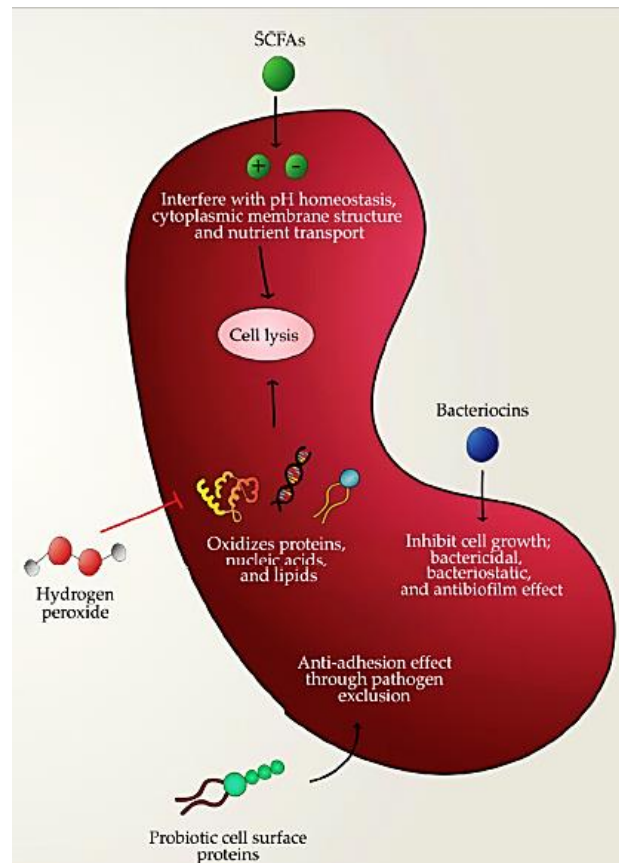
Kandungan komposisi dan konsentrasi metabolit sekunder pada kombucha tergantung pada sumber inokulum, konsentrasi gula dan teh, waktu fermentasi, dan suhu yang digunakan. Setiap perubahan dalam kondisi fermentasi dapat mempengaruhi produk akhir. Komponen utama pada kombucha ditunjukkan pada tabel 2.3.

**Tabel 2. 3. Komponen utama kombucha**

	Senyawa	Kandungan	Sukrosa Awal (g/L)	Waktu Fermentasi (Hari)
Asam organik	Asam asetat	5,6 g/L	70	15
	Asam asetat	8,36 g/L	100	18
	Asam asetat	11 g/L	100	30
	Asam glukonat	39 g/L	100	60
	Asam glukoronat	0,0160 g/L	70	21
	Asam laktat	0,18 g/L	100	18
Vitamin	Vitamin B1	0,74 mg/mL	70	15
	Vitamin B2	8 mg/100 mL	70	10
	Vitamin B6	0,52 mg/mL	70	15
	Vitamin B12	0,84 mg/mL	70	15
	Vitamin C	25 mg/L	70	10
Komposisi umum	Etanol	5,5 g/L	100	20
	Protein	3 mg/mL	100	12
	Polifenol	7,8 Mm GAE	100	15
Mineral	Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	0,1-0,4 $\mu$ g/mL	70	15
Anion	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,04-3,20 mg/g	100	7

Villarreal-Soto *et al.* (2018)

Kandungan dalam kombucha didominasi oleh asam asetat yang diketahui berpotensi mencegah pertumbuhan bakteri patogen gram positif dan gram negatif seperti *E. coli* yang dapat menyebabkan ISK. Asam asetat berpotensi merusak struktur bilayer lipid bakteri dengan memasukkan proton ke dalam sitoplasma sehingga menyebabkan sitoplasma dalam kondisi asam, kehilangan energi, dan denaturasi protein. Terjadinya kerusakan sel bakteri patogen dapat dikarenakan sitoplasma bakteri patogen menjadi asam. Hal tersebut dikarenakan asam organik pada kombucha yang mampu menurunkan pH substrat (Kumar & Joshi, 2016).



**Gambar 2. 3. Mekanisme probiotik dalam merusak bakteri** (Mantziari *et al.*, 2020)

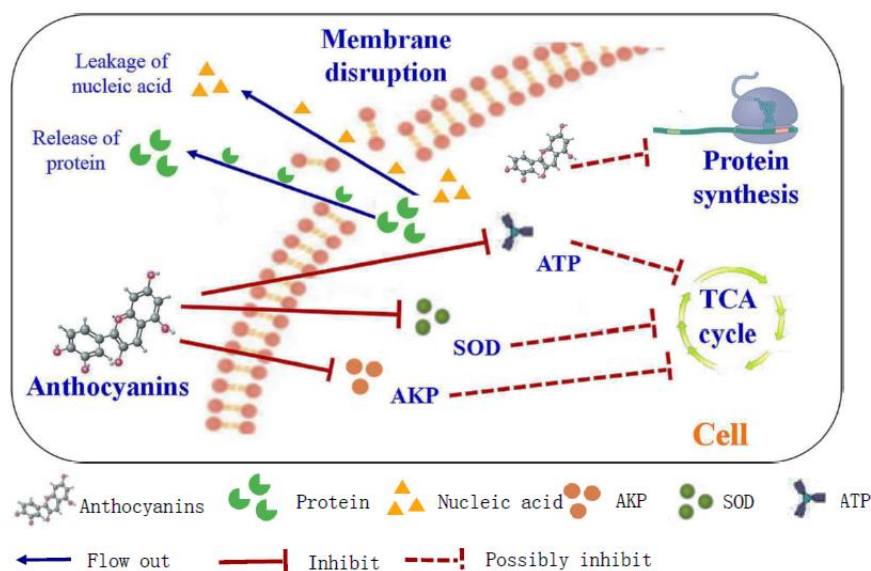
Menurut Mantziari *et al.* (2020) metabolit bakteri probiotik seperti asam laktat, asam organik, bakteriosin, protease, peroksida, dan eksopolisakarida diketahui memiliki sifat antibakteri dan antijamur. Asam organik seperti asam lemak rantai pendek atau *short chain fatty acids* (SCFAs) terutama asam asetat, asam propionat, asam butirat, dan asam format bekerja melawan bakteri patogen dengan mengganggu struktur membran sitoplasma, transportasi nutrisi, serta mempengaruhi sintesis makromolekul. Probiotik juga berfungsi sebagai anti adhesi melalui *pathogen axclusion* yaitu mencegah masuknya suatu patogen ke suatu wilayah sehingga tidak terdapat media bagi patogen untuk melakukan invasi pada *host* (Gambar 2.3).

Fermentasi kombucha pada bunga telang biru diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada bunga telang biru berkhasiat sebagai bentuk pertahanan dan pengendalian suatu bakteri patogen. Salah satu senyawa aktif yang terdapat dalam bunga telang biru yaitu antosianin yang berkhasiat sebagai antioksidan hingga antibakteri. Kandungan total asam yang terdapat pada kombucha mempengaruhi ekstraksi antosianin. Kandungan asam asetat yang semakin tinggi maka antosianin yang terekstrak semakin banyak. Konsentrasi asam asetat optimal dalam ekstraksi antosianin yaitu 1-2% (Soeroso *et al.*, 2017).

Mekanisme senyawa antosianin sebagai antibakteri yaitu dengan merusak membran dan menurunkan aktivitas SOD (*superoxide dismutase*), ATP (*adenosine triphosphate*) dan AKP (*alkaline phosphate*). Penelitian Sun *et al.* (2018) menunjukkan bahwa antosianin merusak integritas membran sel dengan cara membentuk senyawa kompleks dari protein ekstraseluler dan terlarut yang menyebabkan membran sel rusak sehingga molekul-molekul seperti asam nukleat akan bocor keluar dan dapat menyebabkan bakteri lisis.

SOD merupakan enzim pelindung penting yang dimiliki setiap organisme biologis dan berfungsi dalam menangkal radikal bebas. Semakin rendah aktivitas SOD menyebabkan semakin lemah kemampuan bakteri dalam menangkal radikal bebas. Antosianin diketahui dapat mencegah pertumbuhan bakteri patogen dengan mengendalikan kemampuan perlindungan diri bakteri patogen dengan cara menurunkan aktivitas SOD suatu bakteri patogen. Antosianin juga menghambat aktivitas dari ATP dan AKP yang memungkinkan terjadinya penghambatan siklus krebs atau siklus asam trikarboksilat (TCA). Siklus krebs merupakan siklus yang

berperan penting dalam metabolisme bakteri sehingga jika proses siklus krebs terhambat dapat menyebabkan metabolisme bakteri tidak dapat berjalan dengan baik (Gambar 2.4).



**Gambar 2. 4. Mekanisme antosianin sebagai antibakteri (Sun *et al.*, 2018)**

### 2.3 Antimikroba

Antimikroba merupakan bahan alami atau sintetik yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh suatu mikroorganisme. Agen yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme disebut sebagai agen statis (*static agent*) seperti fungistatik, bakteristatik, dan viristatik. Sedangkan agen yang dapat membunuh mikroorganisme yaitu agen sidal (*cidal agent*) fungisidal, bakterisidal, dan virisidal.

Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi proses menghambat dan membunuh mikroorganisme oleh suatu zat antimikroba. Faktor-faktor tersebut menurut Pelczar & E C S (1998) yaitu:



### 1. Jumlah Bakteri

Jumlah bakteri berbanding lurus dengan waktu yang diperlukan antibakteri dalam menghambat dan membunuh bakteri. Apabila jumlah bakteri lebih banyak maka waktu yang dibutuhkan suatu antibakteri akan lebih panjang. Kemampuan zat suatu antibakteri akan menurun apabila bakteri memiliki jumlah yang berlebih.

### 2. Waktu Inkubasi

Dalam mempersiapkan senyawa antibakteri perlu diperhatikan waktu inkubasi yang digunakan. Waktu inkubasi tidak boleh terlalu cepat maupun terlalu lama. Aktivitas antibakteri akan kurang sempurna apabila waktu inkubasi terlalu cepat. Hal tersebut disebabkan oleh waktu kontak yang cepat. Akan tetapi, waktu inkubasi yang terlalu lama akan menyebabkan bakteri menjadi resisten terhadap agen antibakteri.

### 3. Stabilitas Obat

Maksud stabilitas obat dalam hal ini yaitu stabilitas kinerja senyawa obat dalam suhu panas. Umumnya reaktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen akan meningkat apabila terjadi peningkatan suhu sehingga kinerja agen antibakteri akan meningkat. Akan tetapi, peningkatan kinerja antibakteri apabila dipanaskan tidak berlaku pada semua jenis antibakteri. Terdapat beberapa antibakteri akan terhenti aktivitasnya jika berada pada suhu tinggi.

Uji sensitivitas merupakan uji yang dapat digunakan untuk menguji kepekaan atau kerentanan suatu mikroorganisme terhadap antimikroba yang bertujuan untuk mengetahui daya kerja dari suatu antimikroba dalam membunuh mikroorganisme. Uji sensitivitas dapat diketahui dengan berbagai uji laboratorium secara *in vitro*. Menurut Heller & Spence (2019) beberapa metode yang dapat

digunakan dalam uji aktivitas antibakteri yaitu metode difusi cakram, difusi sumuran, dilusi agar, dan dilusi cair.

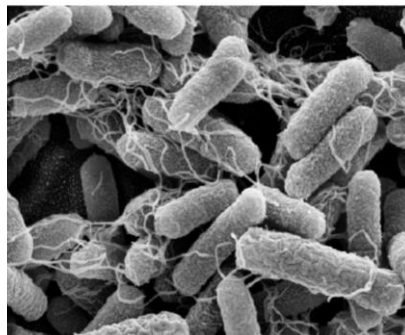
Prinsip dari metode difusi yaitu terdifusinya senyawa antimikroba ke dalam media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Metode difusi dapat dilakukan dengan metode difusi cakram atau sering disebut dengan uji Kirby Bauer dan metode sumuran. Metode dilusi dibedakan menjadi metode dilusi cair dan metode dilusi padat. Pada metode dilusi cair, dapat menentukan *minimum inhibitory concentration* (MIC) atau kadar hambat minimum (KHM) dan *minimum bactericidal concentration* (MBC) atau kadar bunuh minimum (KBM). Metode dilusi cair dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada agen medium cair yang ditambahkan dengan agen mikroba uji. KHM ditetapkan pada larutan uji agen antimikroba dengan kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa pertumbuhan mikroba uji. Larutan uji yang ditetapkan KHM dikultur ulang pada media tanpa penambahan mikroba uji dan agen antimikroba, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. KBM ditetapkan pada media yang tetap terlihat jernih. Metode dilusi padat serupa dengan metode dilusi cair, perbedaannya hanya terletak pada media yang digunakan yaitu media padat (solid) (Yusmaniar *et al.*, 2017).

#### **2.4 Bakteri *Escherichia coli***

*Escherichia coli* merupakan bakteri anggota famili Enterobacteriaceae yang berbentuk batang dan termasuk bakteri anaerob fakultatif gram negatif. *E. coli* umumnya memiliki ukuran lebar 1,1-1,5  $\mu\text{m}$  dan panjang 2-6  $\mu\text{m}$ . *E. coli* dapat berupa motil dan non motil. Bakteri *E. coli* motil memiliki flagella, selain flagella banyak strain *E. coli* memiliki fimbriae atau pili yang merupakan struktur

protein yang memanjang keluar dari permukaan bakteri dan berperan dalam perlekatan sel ke sel lain atau ke jaringan inang. Bakteri *E. coli* tidak hanya memiliki strain komensal melainkan juga memiliki strain patogen yang dapat menyebabkan berbagai penyakit manusia. Bakteri *E. coli* patogen dapat menyebabkan penyakit enterik atau diare, infeksi saluran kemih, hingga sepsis/meningitis (Kaper *et al.*, 2004). Klasifikasi *Escherichia coli* menurut Jawetz *et al.* (2012) yaitu sebagai berikut:

Kingdom : Prokaryota  
Division : Gracilicutes  
Class : Scotobacteria  
Order : Eubacteriales  
Family : Enterobacteriaceae  
Genus : Escherichia  
Species : *Escherichia coli*



**Gambar 2. 5. SEM *Escherichia coli*** (Nascimento *et al.*, 2014)

*E. coli* patogenik diketahui sebagai bakteri yang dapat menimbulkan infeksi seperti infeksi saluran kemih, diare, dan beberapa penyakit lainnya. Terdapat beberapa patotipe yang dimiliki *E. coli* menurut Kaper *et al.* (2004) yaitu *E. coli*

penghasil shiga toksin (STEC), *E. coli* enteropatogenik (EPEC), *E. coli* enterotoksigenik (ETEC), *E. coli* enteroagregatif (EAEC), *E. coli* enteroinvasif (EIEC), *diffusely adherent E. coli* (DAEC). Strain-strain tersebut diklasifikasikan berdasarkan sifat virulensi dan mekanisme patogenisitas yang menyebabkan penyakit gastrointestinal. Terdapat beberapa patotipe *E. coli* yang terdapat pada organ ekstraintestinal seperti *E. coli* neonatal meningitis (NMEC) dan *E. coli* uropatogenik (UPEC) (Alberto *et al.*, 2021). NMEC dapat menyebabkan infeksi otak serta sepsis sedangkan UPEC dapat menyebabkan sepsis dan infeksi saluran kemih.

Saluran kemih adalah salah satu tempat infeksi bakteri yang paling umum dan *E. coli* dengan patotipe uropatogenik sejauh ini merupakan agen infeksi yang paling umum pada saluran kemih. *E. coli* dari sejumlah kecil serogrup O (enam serogrup O menyebabkan 75% ISK) memiliki fenotipe yang secara epidemiologis terkait dengan sistitis dan pielonefritis akut pada saluran kemih normal, yang meliputi ekspresi *P fimbriae*, hemolisin, aerobaktin, resistensi serum dan enkapsulasi.

Bakteri *E. coli* dapat mengalami mengalami mutasi dan menjadi organisme penghasil *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase* (ESBL). ESBL merupakan enzim yang dapat menghidrolisis antimikroba golongan  $\beta$ -laktam. Gen yang mengendalikan produksi  $\beta$ -laktamase terletak di plasmid atau kromosom (Haghighatpanah *et al.*, 2016). Penyebab mutasi dapat terjadi karena diperolehnya informasi genetik yang baru atau terjadinya perubahan tingkat ekspresi gen *wild type*. Penyebab mutasi tersebut termasuk dalam resistensi sekunder. Faktor penentu resistensi sekunder adalah elemen genetik *mobile* yang diperoleh secara

bersamaan. Gen ESBL ditransferkan melalui elemen genetik *mobile* yang berbeda seperti plasmid, transposon, elemen *insertion sequence* (IS), integron kelas 1, dan elemen ISCR1 yang mengandung integron (Poirel *et al.*, 2008). Variasi dari mekanisme transfer genetik berkontribusi terhadap penyebaran gen secara cepat. Hal ini memudahkan kemampuan gen ESBL untuk berpindah dari satu organisme ke organisme lain sehingga penyebaran resistensi sangat mudah terjadi.

Resistensi bakteri terhadap  $\beta$ -laktam memiliki tiga jalur yaitu penghancuran enzim  $\beta$ -laktamase pada antibiotik, penurunan *uptake* intraseluler antibiotik, dan perubahan target pada antibiotik. Jalur penyebab utama terjadinya resistensi yaitu produksi  $\beta$ -laktamase pada bakteri dan menghancurkan  $\beta$ -laktam pada antibiotik. Resistensi bakteri pada antibiotik golongan  $\beta$ -laktam dilakukan dengan cara memecah struktur antibiotik yang akan merubah struktur obat dan menghalangi ikatan *penicilin binding protein* (PBPs) (Forbes *et al.*, 2007).

## 2.5 Infeksi Saluran Kemih

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan infeksi yang menunjukkan adanya mikroorganisme pada saluran kemih ditandai dengan keberadaan kolonisasi bakteri dalam saluran kemih. Indikator utama dari infeksi saluran kemih yaitu bakteriuria, kondisi ini menunjukkan keberadaan bakteri di dalam urin. Bakteriuria menunjukkan adanya bakteri dalam kultur urin sebanyak  $\geq 100.000$  CFU/ml. Mikroorganisme penyebab ISK umumnya mikroorganisme yang berasal dari flora normal usus serta hidup komensal di kulit perineum, prepusium penis, introitus vagina, dan sekitar anus.

### 2.5.1 Klasifikasi ISK

#### 1. Berdasarkan Lokasi Infeksi

##### a. ISK Bawah (Sistitis)

Sistitis merupakan keadaan peradangan atau inflamasi oleh bakteri terhadap mukosa buli-buli. Bakteri masuk ke buli-buli melalui uretra. Gejala yang terjadi pada penderita ISK bawah yaitu sering berkemih, nyeri pada daerah suprapubis, disuria. Jumlah koloni bakteri sebesar  $> 10^3$  CFU/ml ditemukan pada penderita ISK bawah (Pardede, 2018).

##### b. ISK Atas (Pielonefritis)

Pielonefritis merupakan keadaan peradangan atau inflamasi pada parenkim ginjal dan pielum. Gejala klinis yang terjadi pada penderita ISK atas yaitu nyeri daerah perut dan pinggang, demam tinggi, sakit kepala, mual dan muntah, sering berkemih hingga disuria. Jumlah koloni bakteri yang terdapat pada penderita ISK atas sebesar  $> 10^4$  CFU/ml (Grabe *et al.*, 2015).

#### 2. Berdasarkan Gejala

Terdapat beberapa jenis ISK berdasarkan gejalanya seperti ISK asimtomatik yaitu terdapatnya bakteriuria bermakna tanpa gejala. Jenis kedua adalah ISK simptomatik yaitu terdapatnya bakteriuria disertai adanya gejala. Selain itu, juga terdapat ISK non spesifik yaitu ISK yang sulit dikategorikan ke dalam sistitis atau pielonefritis baik berdasarkan pemeriksaan penunjang maupun gejala klinik (Pardede *et al.*, 2011).

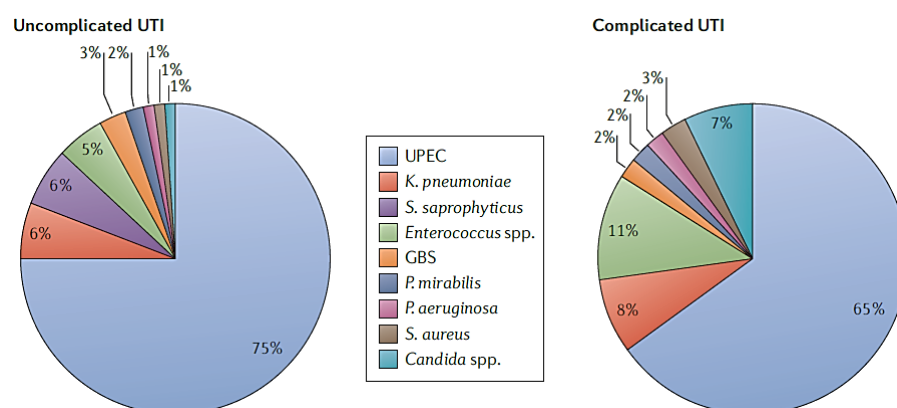
#### 3. Berdasarkan Kelainan Saluran Kemih

ISK berdasarkan kelainan saluran kemih dibagi menjadi dua macam yaitu ISK *complicated* (rumit) dan ISK *uncomplicated* (sederhana). ISK *complicated*

merupakan infeksi saluran kemih yang disertai dengan adanya kelainan struktur anatomi saluran kemih. Sedangkan ISK *uncomplicated* merupakan infeksi saluran kemih yang tidak disertai dengan adanya kelainan struktur anatomi saluran kemih (Grabe *et al.*, 2015).

### 2.5.2 Mikroorganisme Penyebab ISK

Infeksi saluran kemih dapat disebabkan oleh bakteri gram negatif, gram positif, serta beberapa jamur tertentu. Agen penyebab paling umum untuk ISK *complicated* (rumit) dan *uncomplicated* (sederhana) yaitu *E. coli* uropatogenik (UPEC). Agen penyebab ISK *uncomplicated* paling umum setelah UPEC yaitu *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* grup B (GBS), *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida* spp. Agen penyebab ISK *complicated* paling umum setelah UPEC yaitu *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *Candida* spp., *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, dan GBS (Flores-Mireles *et al.*, 2015).



**Gambar 2. 6. Mikroorganisme penyebab ISK (Flores-Mireles *et al.*, 2015)**

### 2.5.3 Patofisiologi ISK

ISK dapat terjadi ketika mikroorganisme masuk ke dalam saluran kemih dan berkembang biak. Terdapat beberapa cara mikroorganisme memasuki saluran kemih, antara lain (Purnomo & Basuki, 2014):

#### 1. *Ascending*

Mikroorganisme penyebab ISK umumnya merupakan flora normal usus dan hidup komensal di kulit perineum, preposium penis, introitus vagina, dan sekitar anus. Infeksi secara *ascending* atau naik terjadi melalui 4 tahapan, yaitu:

- a. Kolonisasi mikroorganisme di daerah introitus vagina dan uretra
  - b. Mikroorganisme masuk ke dalam buli-buli
  - c. Multiplikasi dan penempelan mikroorganisme di kandung kemih
  - d. Mikroorganisme naik ke ginjal dari kandung kemih
2. *Descending* (Hematogen), infeksi secara *descending* atau turun terjadi apabila sebelumnya terdapat infeksi pada ginjal sehingga menyebar melalui pembuluh darah ke dalam saluran kemih.
3. Limfogen, infeksi secara limfogen terjadi ketika mikroorganisme masuk melalui sistem limfatik yang menghubungkan kandung kemih dengan ginjal, namun infeksi limfogen sangat jarang terjadi.
4. Infeksi secara eksogen atau infeksi secara langsung dari organ sekitar yang sebelumnya sudah terinfeksi sebagai akibat dari pemakaian kateter.

### 2.6 Metode pH *Differential*

Metode pH *differential* telah digunakan secara luas oleh ahli teknologi pangan dan hortikultura untuk menilai kualitas buah dan sayuran segar. Metode



pH differential juga dapat digunakan untuk penentuan kandungan antosianin total, berdasarkan perubahan struktural kromofor antosianin antara pH 1,0 dan 4,5. Pendekatan ini secara resmi telah diadopsi sebagai metode resmi oleh AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*).

Pada pH 1 antosianin ada pada bentuk oxonium berwarna atau kation flavylum dan pada pH 4,5 antosianin ada pada bentuk hemiketal tak berwarna atau karbinol. Prinsip-prinsip tersebut menghasilkan pengukuran kadar antosianin total secara tepat dan akurat. Terdapat dua larutan *buffer* yang digunakan dalam pengukuran kadar antosianin total menggunakan metode pH differential yaitu buffer pH 1 menggunakan potasium klorida dan buffer pH 4,5 menggunakan sodium asetat. Pengukuran absorbansi pada kedua perlakuan pH dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm (Lee, 2005).

## **2.7 Titrasi**

Titration yang juga dikenal sebagai titrimetri merupakan metode laboratorium umum analisis kimia kuantitatif yang digunakan untuk menentukan konsentrasi analit yang tidak diketahui. Titrasi juga dikenal sebagai analisis volumetrik karena pengukuran volume memainkan peran penting dalam titrasi. Titrasi adalah metode penentuan kadar suatu larutan dengan larutan lain yang diketahui konsentrasinya.

Titration mengacu pada analisis kimia kuantitatif dan dilakukan dengan menetapkan volume larutan yang konsentrasinya diketahui dan diperlukan untuk bereaksi dengan larutan yang akan dianalisis. Sebuah reagen yang disebut titran atau titrator digunakan sebagai larutan standar. Secara umum terdapat dua jenis

larutan standar yaitu larutan standar primer dan larutan standar sekunder. Larutan standar primer merupakan larutan yang menjadi acuan dalam proses standarisasi. Larutan standar primer jika disimpan dalam waktu yang lama memiliki sifat yang stabil dan konsentrasi tidak mudah berubah. Larutan standar sekunder merupakan larutan yang akan distandarisasi dan digunakan untuk proses analisis sampel (Medwick & Kirschner, 2010).

## **2.8 Uji *In Silico* Melalui Pendekatan *Molecular Docking***

*In silico* adalah metode dengan menggunakan bantuan perangkat komputer yang meliputi penggunaan *database*, pengolahan data, identifikasi kekerabatan, pemodelan dan penambatan molekuler (*molecular docking*). *Molecular docking* merupakan metode komputasi yang mempelajari bagaimana dua atau lebih struktur molekul dapat berikatan satu sama lain. Prinsip dalam *molecular docking* yaitu menambatkan ligan pada sisi aktif reseptor sehingga interaksi yang terjadi dapat di analisis. Di bidang desain obat molekuler, hubungan antara molekul yang signifikan secara farmakologis seperti protein, asam nukleat, karbohidrat, dan lipid memainkan peran penting dalam transduksi sinyal. Selanjutnya, molekul yang berinteraksi tersebut dapat mempengaruhi jenis sinyal yang dihasilkan seperti agonis dan antagonisme.

### **2.8.1 Sumber Informasi *Database***

Reseptor dan ligan yang dibutuhkan dalam proses *molecular docking* dapat diperoleh melalui *database*. Beberapa *database* yang dapat digunakan yaitu:

### 1. *Protein Data Bank*

*Protein Data Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) merupakan *database* struktur tiga dimensi makromolekul biologis termasuk asam nukleat dan protein. Molekul-molekul tersebut adalah molekul yang ditemukan pada semua organisme termasuk bakteri, hewan, tumbuhan, dan manusia. Struktur yang terdapat pada PDB mulai dari protein kecil, potongan DNA, hingga molekul kompleks seperti ribosom (Berman *et al.*, 2000).

### 2. PubChem

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) merupakan *database* informasi tentang zat kimia dan aktivitas biologisnya. PubChem diluncurkan pada tahun 2004 sebagai komponen dari *Molecular Libraries Roadmap Initiatives* dari US *National Institutes of Health* (NIH). Selama 11 tahun terakhir, PubChem telah berkembang menjadi sistem yang cukup besar dan berfungsi sebagai sumber informasi molekul untuk komunitas riset ilmiah (Kim *et al.*, 2016).

## 2.8.2 Perangkat Lunak (*Software*)

Beberapa perangkat lunak yang dibutuhkan dalam proses *molecular docking* yaitu:

### 1. PyMOL

PyMOL adalah sistem visualisasi molekuler yang dibuat oleh Warren Lyford DeLano dan dikomersialkan oleh DeLano Scientific LLC. PyMOL merupakan perangkat lunak alat grafik molekuler yang telah banyak digunakan untuk visualisasi 3 dimensi (3D) protein, asam nukleat, molekul kecil, hingga densitas elektron. Visualisasi sangat penting dilakukan untuk memahami struktur

dari suatu molekul. Penemuan fungsi obat komputasi pada PyMOL telah berhasil diterapkan untuk menemukan kandidat obat baru untuk berbagai target (Yuan *et al.*, 2017).

## 2. *AutoDock Vina*

*AutoDock Vina* merupakan *software* yang dapat digunakan untuk penambatan molekul dan skrining virtual. *Vina* memiliki tingkat kinerja tinggi dan fungsi yang beragam. Perangkat lunak ini dapat memproses penambatan lebih dari satu molekul sekaligus. Program *docking* atau penambatan molekuler umumnya menggunakan fungsi *scoring* yang dapat dilihat untuk memperkirakan potensi kimia standar dari sistem *AutoDock Vina* (Trott & Olson, 2010).

## 3. *Discovery Studio*

*Discovery studio* merupakan perangkat lunak yang dapat digunakan untuk visualisasi struktur molekul agar dapat dilihat gambaran yang interaktif dari struktur tersebut. *Software* ini menampilkan gambar dengan kualitas tinggi dari hasil visualisasi suatu struktur senyawa. *Discovery studio* memberikan korelasi hasil yang baik dengan aktivitas farmakologis yang terlihat (Pawar & Rohane, 2021).

## 4. *PASS Online*

*PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances)* adalah salah satu *software online* yang dapat digunakan sebagai alat prediksi aktivitas biologi dari suatu senyawa. Analisis *PASS* dilakukan berdasarkan SAR (*Structure Activity Relationship*) atau hubungan antara struktur suatu senyawa dengan aktivitas yang dimilikinya. *PASS* dapat memprediksi lebih dari 300 efek farmakologis dan mekanisme biokimia berdasarkan rumus struktur suatu zat (Lagunin, dkk., 2000).

## 5. *SwissADME*

*SwissADME* merupakan salah satu *software online* yang dapat digunakan untuk memprediksikan berbagai macam sifat dari struktur kimia yang dimiliki suatu senyawa. *Software* ini juga digunakan untuk mendapatkan informasi terkait kemampuan absorpsi, distribusi, metabolisme, ekskresi (ADME) suatu senyawa kimia (Daina *et al.*, 2017).

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari tiga tahap, tahap pertama yaitu untuk mengetahui pengaruh kombucha bunga telang (*C. ternatea* L.) biru terhadap aktivitas antibakteri *E. coli* ESBL. Tahap kedua yaitu untuk mengetahui konsentrasi terendah gula dalam kombucha bunga telang biru dalam membunuh dan menghambat bakteri uji dengan konsentrasi (b/v) sebagai berikut:

K1 : 20%

K2 : 30%

K3 : 40%

K4 : 50%

K+ : Meropenem

K- : Akuades steril

Tahap ketiga yaitu untuk mengetahui aktivitas inhibitor senyawa aktif bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL secara *in silico*. Terdapat 24 kali percobaan pada penelitian ini, dimana masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Juni 2022 di Laboratorium Biokimia dan Mikrobiologi Program Studi Biologi Fakultas Sains

dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang serta Laboratorium Mikrobiologi-Parasitologi Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) UIN Malang.

### 3.3 Alat dan Bahan

#### 3.3.1 Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini terdiri dari alat untuk proses pembuatan kombucha bunga telang biru, alat untuk proses uji aktivitas antibakteri, dan alat untuk uji *in silico*. Alat yang digunakan dalam proses pembuatan kombucha bunga telang biru yaitu gelas ukur (IWAKI), timbangan digital (Digipounds), pengaduk, penyaring, toples kaca (Yoshikawa), *stove* (Adoolla), kain penutup, karet, dan *thermometer* (OEM).

Alat yang digunakan dalam proses uji fitokimia, uji aktivitas antibakteri dan penghitungan nilai KHM beserta KBM yaitu *hotplate* (Thermolyne), neraca analitik (Mettler Toledo), autoklaf (Lequitron), inkubator (Mettmert), korek api, kuvet (Hellma), koloni *counter*, *erlenmeyer* (IWAKI), tip dan mikropipet (SOCOREX), tabung reaksi (IWAKI), gelas ukur (IWAKI), labu ukur (IWAKI), pipet tetes, pipet volume (IWAKI), *rubber bulb*, corong gelas, buret (IWAKI), klem dan statif, penangas air, kaca preparate (Sail Brand), mikroskop (Euromex), jarum ose, jangka sorong, *spatula*, *drigalsky*, *cork borer*, cawan petri (IWAKI), *plastic wrap*, *stirrer*, *laminar airflow* (LAF), kapas, *aluminium foil*, bunsen dan *vortex* (IKA). Alat yang digunakan dalam uji *in silico* yaitu perangkat komputer dengan spesifikasi windows 10 64bit, *software SwissADME*, *Discovery Studio*, *PASS Prediction*, *Protein Data Bank*, *PubChem*, *PyMOL*, *PyRx AutoDock Vina*.

### 3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu bunga telang biru kering, air, gula pasir, *starter* kombucha, SCOBY, isolat bakteri *Escherichia coli* ESBL, media NA (*Nutrient Agar*), media NB (*Nutrient Broth*), media TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), etanol 70%, KCl, HCl 0,2 N, aquades, asam oksalat, indikator *phenolptalein* (pp) 1%, NaOH 0,1 N, HCl 2 N, pereaksi Mayer, Dragendorff, Wagner, amil alkohol, serbuk magnesium, FeCl<sub>3</sub>, NaCl 0,9%, kristal violet, safranin, iodine, meropenem, ceftazidime, tisu, kertas label, struktur *canonical SMILES*, 2D, dan 3D cephalotaxine; clitorin; quercetin 3-(6"-malonylneoheesperidoside); ternatin; dan struktur 3D *E. coli* ESBL (PDB ID: 6NVU).

### 3.4 Variabel

Variabel-variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kontrol yaitu sebagai berikut:

#### 1. Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini yaitu kombucha bunga telang biru yang dibuat dalam beberapa konsentrasi (20%, 30%, 40%, 50%) dan senyawa aktif bunga telang biru (cephalotaxine, clitorin, quercetin 3-(6"-malonylneoheesperidoside), dan ternatin).

#### 2. Variabel Terikat

Variable terikat dari penelitian ini yaitu kadar total asam, pH, antosianin total, zona hambat yang dihasilkan, nilai KHM dan KBM, karakter farmakokinetik, nilai uji PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*),



nilai energi bebas (*binding affinity*) dan *binding pose* dari hasil interaksi senyawa aktif (ligan) dengan reseptor *E. coli* ESBL.

### 3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol dari penelitian ini yaitu media yang digunakan, suhu, dan waktu inkubasi dalam menumbuhkan bakteri.

## 3.5 Prosedur Penelitian

### 3.5.1 Pembuatan Kombucha Bunga Telang Biru

Diseduh 12 gr bunga telang biru kering dengan air suhu 80°C 600ml, 15 menit. Air seduhan disaring untuk memisahkan bunga dengan air teh. Kemudian ditambahkan gula dengan konsentrasi masing masing 20%, 30%, 40%, 50% (b/v) dan dilarutkan. Disaring agar air teh bersih. Kemudian air teh dimasukkan toples kaca. Setelah itu didinginkan sampai suhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ . Waktu mendinginkan tidak lebih dari 4 jam. Kemudian sebelum 4 jam dan air teh sudah dingin ditambahkan 10% starter kombucha dan nata (SCOBY). Ditungkup dengan kain dan diikat dengan karet. Kemudian difermentasi selama 14 hari dengan suhu ruang dan tidak boleh langsung terkena sinar matahari (Wistiana & Zubaidah, 2015).

### 3.5.2 Analisis Kadar Total Asam Kombucha Bunga Telang Biru

Analisis total asam menggunakan metode titrasi (SNI 01-3546-2004). Analisis total asam menggunakan metode titrasi terdapat beberapa tahap yaitu standarisasi NaOH dan pengukuran kandungan total asam kombucha bunga telang biru. Larutan standar disiapkan dengan dimasukkan 0,1 g asam oksalat ke dalam labu ukur 250 ml dan dilarutkan dengan 25 ml aquades. Larutan ditetesi indikator

*phenolptalein* (pp) 1% 2-3 tetes. Larutan dititrasi dengan larutan NaOH hingga terbentuk warna merah muda yang bertahan 15 detik. Normalitas NaOH dihitung dengan rumus (Rohman *et al.*, 2019):

$$\text{Normalitas NaOH} = \frac{V (\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \times 2}{\text{Mr} ((\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) \times V \text{ NaOH}}$$

Keterangan:

$V (\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : jumlah asam oksalat (gr)

$\text{Mr} (\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : massa molekul relatif asam oksalat (126)

$V \text{ NaOH}$  : volume NaOH (L)

Kandungan total asam pada kombucha diukur dengan 10 ml kombucha bunga telang biru dilarutkan menjadi 250 ml. Diambil sebanyak 50 ml dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan 2-3 tetes indikator *phenolptalein* (pp). Dititrasi sampel kombucha bunga telang biru dengan larutan NaOH 0,1 N hingga warna merah muda terbentuk. Pembacaan skala saat warna merah muda terbentuk pertama kali dan bertahan 15 detik. Kadar total asam (%) diukur dengan rumus sebagai berikut (Rohman *et al.*, 2019):

$$\text{Total Asam (\%)} = \frac{V \text{ titran} \times N \text{ titran} \times \text{FP} \times \text{BM} \text{ CH}_3\text{COOH}}{V \text{ sampel} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

$V \text{ titran}$  : jumlah larutan NaOH untuk titrasi (ml)

$N \text{ titran}$  : normalitas NaOH

$\text{FP}$  : faktor pengenceran

$\text{BM}$  : berat molekul asam asetat (60)

$V \text{ sampel}$  : volume sampel kombucha (ml)

### 3.5.3 Analisis pH Kombucha Bunga Telang Biru

pH kombucha diukur menggunakan pH meter (pH 201 digital). pH meter dikalibrasi dengan buffer pH 4 dan pH 7 sebelum digunakan untuk mengukur pH sampel.

### 3.5.4 Analisis Antosianin Total Kombucha Bunga Telang Biru

Kadar antosianin total diukur dengan menggunakan metode pH *differential* dengan menggunakan larutan pH 1 dan pH 4,5. Larutan pH 1 dibuat dengan 1,49 gr KCl dilarutkan dengan aquades dalam tabung volumetrik 100 ml sampai batas. Dicampurkan 25 ml larutan KCl dengan HCl 0,2 N hingga pH mencapai 1. Larutan pH 4,5 dibuat dengan 1,64 gr sodium asetat dilarutkan dengan aquades dalam tabung volumetrik 100 ml sampai batas. Dicampurkan 25 ml larutan sodium asetat dengan HCl 0,2 N hingga pH mencapai 4,5. Pada 1 ml kombucha bunga telang biru ditambahkan 9 ml larutan KCl pH 1, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dihomogenkan (didiamkan hingga 15 menit). Hal yang sama dilakukan pada larutan  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  pH 4,5. Absorbansi antosianin diukur pada panjang gelombang 520 nm dan 700 nm. Kadar antosianin total ditentukan menggunakan persamaan (Lee, 2005):

$$A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$$

$$\text{Antosianin Total (mg/L)} = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Keterangan:

A : nilai absorbansi sampel

MW : berat molekul ternatin (1638 g/mol)

DF : faktor pengenceran (v total/v sampel)

$\epsilon$  : absorbtivitas molar ternatin ( $29000 \text{ L} \times \text{cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$ )

I : lebar kuvet (1 cm)

### 3.5.5 Uji Fitokimia Kombucha Bunga Telang Biru

#### 1. Uji Alkaloid

Sebanyak 5 ml sampel ditambahkan asam klorida 2 N sebanyak 1 ml dan 10 ml air. Campuran dipanaskan pada penangas air selama 2 menit. Selanjutnya campuran didinginkan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 tabung reaksi. Pada tabung pertama dimasukkan pereaksi Mayer, pada tabung kedua dimasukkan pereaksi Dragendorff, dan pada tabung ketiga dimasukkan pereaksi Wagner (Yuningtyas *et al.*, 2021).

#### 2. Uji Flavonoid

Dipanaskan 5 ml sampel selama 5 menit setelah itu sampel disaring. Ditambahkan serbuk magnesium, amil alkohol, dan HCl:etanol (1:1) pada filtrat yang diperoleh. Terbentuknya endapan jingga hingga merah ungu menandakan adanya kandungan senyawa flavonoid.

#### 3. Uji Saponin

Dilakukan pengocokan kuat pada sampel yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml. Adanya kandungan senyawa saponin ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil.

#### 4. Uji Tanin

Sebanyak 5 ml sampel ditetesi  $\text{FeCl}_3$  1%. Munculnya warna hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan senyawa tanin.

### 3.5.6 Pembuatan Media

Pembuatan media NA (*Nutrient Agar*) dilakukan dengan sebanyak 28 gr dilarutkan ke dalam 1 L akuades, kemudian diaduk dan dipanaskan menggunakan *magnetic stirrer*. Media dimasukkan ke tabung reaksi ditutup menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit (Yusmaniar *et al.*, 2017).

Pembuatan media NB (*Nutrient Broth*) dilakukan dengan sebanyak 13 gr dilarutkan ke dalam 1 L akuades kemudian diaduk dan dipanaskan menggunakan *magnetic stirrer*. Media dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* dan ditutup menggunakan kapas, setelah itu disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit (Yusmaniar *et al.*, 2017).

Pembuatan media *triple sugar iron agar* (TSIA) dilakukan dengan sebanyak 64,52 gr dilarutkan ke dalam 1 L akuades kemudian diaduk dan dipanaskan menggunakan *magnetic stirrer*. Dimasukkan media ke dalam *erlenmeyer* dan ditutup menggunakan kapas. Disterilisasi media pada suhu 121°C selama 15 menit. Dituangkan 7 mL media pada masing-masing tabung reaksi dan dimiringkan pada kemiringan 30° sampai memadat.

### 3.5.7 Peremajaan Biakan *Escherichia coli* ESBL

Peremajaan bakteri *E. coli* ESBL bertujuan agar bakteri memulai metabolisme kembali setelah penyiapan. Peremajaan bakteri dilakukan dengan disterilkan media NA selama 15 menit dalam autoklaf pada suhu 121°C. Kemudian media didiamkan selama 60 menit dalam keadaan miring. Diambil satu jarum ose biakan murni kemudian digoreskan dalam permukaan miring dan

ditutup dengan kapas, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Yusmaniar *et al*, 2017).

### **3.5.8 Pembuatan Inokulum *Escherichia coli* ESBL**

Bakteri uji hasil peremajaan disuspensikan dan dihomogenkan ke dalam media NB sebanyak 100 mL dan ditutup rapat dengan kapas. Selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil inokulum kemudian diencerkan dari pengenceran  $10^{-1} - 10^{-6}$ . Pengenceran pertama dilakukan dengan mengencerkan dan menghomogenkan 1 ml suspensi bakteri uji ke dalam 9 ml NaCl 0,9% steril, pengenceran kedua hingga terakhir dilakukan dengan mengencerkan dan menghomogenkan 1 mL suspensi bakteri dari pengenceran sebelumnya ke dalam 9 mL NaCl 0,9% steril. Kekeruhan bakteri dihitung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm. Hasil dengan nilai absorbansi 0,08-0,1 setara dengan larutan Mc Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL) (Kosasi *et al.*, 2019).

### **3.5.9 Pengujian Konfirmasi *Escherichia coli* ESBL**

Pengujian konfirmasi bakteri terdiri dari beberapa tahapan yaitu pewarnaan gram, uji TSIA, dan uji pemastian ESBL. Pewarnaan dilakukan dengan membuat bekas isolat di gelas obyek, preparat bakteri uji dibuat dengan cara dioleskan bakteri uji pada gelas objek dan difiksasi dengan api pembakar bunsen. Bakteri yang sudah difiksasi ditetesi dengan kristal violet dan didiamkan hingga 60 detik. Apusan bakteri dibilas dengan aquades dan dikeringkan. Apusan bakteri yang sudah kering ditetesi dengan iodine dan ditunggu hingga 60 detik untuk kemudian

dibilas dan ditetesi alkohol serta ditunggu hingga 30 detik. Apusan dibilas dengan aquades yang kemudian ditetesi safranin dan ditunggu hingga 60 detik. Kemudian apusan dibilas dengan aquades dan dikeringkan untuk dilakukan pengamatan. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop, bakteri gram negatif berwarna merah (Fardiaz, 1992).

Uji *triple sugar iron agar* (TSIA) dilakukan dengan diinokulasikan isolat bakteri secara aseptik dengan jarum ose dengan cara ditusuk pada bagian tengah sampai kedalaman  $\frac{3}{4}$  bagian dari permukaan media dan kemudian digores pada bagian miring dari media. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 1x24 jam. Uji TSIA merupakan uji biokimia yang bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam memfermentasikan gula yang terdapat dalam media TSIA. Apabila mikroorganisme hanya dapat memfermentasikan glukosa, maka bagian *butt* media berwarna kuning dan bagian *slantnya* berwarna merah. Apabila mikroorganisme dapat memfermentasikan laktosa atau sukrosa atau keduanya, maka bagian *butt* dan *slant* media akan berwarna kuning (Kosasi *et al.*, 2019).

Uji pemastian ESBL dilakukan berdasarkan panduan dari *Clinical and Laboratory Standar Institute* (CLSI) (CLSI, 2016). Suspensi bakteri ditambahkan pada *Nutrient Agar* (NA) sampai seluruh permukaan cawan petri tertutup dan diratakan menggunakan *drigalsky*. Dibuat lubang sumuran menggunakan *cork borer*. Dimasukkan antibiotik ceftazidime (0,3 mg/mL) ke dalam sumuran dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif menunjukkan bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBL apabila zona hambat yang dihasilkan pada ceftazidime sebesar  $\leq 22$  mm.

### 3.5.10 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan dituang 15 mL media NA ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga padat (*base layer*). Dimasukkan 8 µL inokulum ESBL pada 10 mL media NA, divorteks, kemudian dituang dalam *base layer* dan didiamkan hingga padat (*seed layer*). Dibuat sumuran pada media yang terbentuk. Dimasukkan kombucha bunga telang biru dengan masing-masing perlakuan konsentrasi gula sebanyak 50 µL ke dalam sumuran yang telah dibuat. Setelah itu, ditambahkan kontrol positif dengan memasukkan larutan meropenem (0,1 mg/mL) dan kontrol negatif dengan memasukkan akuades sebanyak 50 µL selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati zona bening di sekitar sumuran dan diukur menggunakan jangka sorong (Fikriyah *et al.*, 2021).

$$\text{Luas Zona Hambat (mm)} = \frac{d_1 + d_2}{2} - x$$

Keterangan:

$d_1$  : diameter zona hambat secara vertikal (mm)

$d_2$  : diameter zona hambat secara horizontal (mm)

$x$  : diameter lubang sumuran (6 mm)

**Tabel 3. 1. Kategori zona hambat**

Zona Hambat	Kategori
< 5 mm	Lemah
5 - 10 mm	Sedang
10 - 19 mm	Kuat
≥ 20 mm	Sangat kuat

Davis & Stout (1971)



### 3.5.11 Penentuan KHM dan KBM

Penentuan KHM dan KBM dilakukan dengan metode dilusi menggunakan media cair *Nutrien Broth* (NB) dan diukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis sebelum dan sesudah inkubasi untuk melihat pertumbuhan bakteri uji. Nilai KHM ditentukan dengan mengurangi nilai absorbansi setelah perlakuan inkubasi dengan nilai absorbansi sebelum perlakuan. Apabila terdapat konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri, ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan, maka didapatkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

Disiapkan 2 tabung reaksi sebagai kontrol, tabung ke-1 digunakan sebagai kontrol negatif yang diisi dengan 9 mL NB, ditambahkan 0,5 mL aquades dan 0,5 mL suspensi bakteri *E. coli* ESBL, sedangkan tabung ke-2 digunakan sebagai kontrol positif yang diisi dengan 9 mL NB, ditambahkan 0,5 mL meropenem dan 0,5 mL suspensi bakteri *E. coli* ESBL.

Pengujian KHM pada suspensi bakteri *E. coli* ESBL, tabung diisi dengan masing-masing 9 mL NB steril, ditambahkan 0,5 mL suspensi bakteri *E. coli* ESBL dan 0,5 mL kombucha bunga telang biru dengan konsentrasi berurutan yaitu 20%, 30%, 40%, 50%. Setelah itu dihomogenkan dengan vortex, dan dihitung nilai OD sebelum inkubasi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan dihitung nilai OD setelah inkubasi (Munfaati *et al.*, 2015).

Penentuan uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) merupakan lanjutan dari uji KHM, diawali dengan menyiapkan media NA ke dalam cawan petri steril, ditunggu sampai media NA memadat. Media NA yang sudah memadat kemudian dimasukkan 200  $\mu$ L larutan hasil uji KHM yang mana telah dipilih konsentrasi

kombucha bunga telang biru sesuai kriteria yang telah ditentukan, serta kontrol positif dan negatif, kemudian diratakan secara *spread plate* menggunakan *spatula drigalsky*. Masing-masing perlakuan diulangi empat kali ulangan. Sampel kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah inkubasi dapat dilihat dan dihitung koloni bakteri yang ada pada cawan petri. Penentuan nilai KBM dengan cara menghitung koloni bakteri yang tumbuh pada media, diamati pada konsentrasi terendah yang mampu membunuh 99,9 % mikroba biakan dengan ditandai media NA bersih tanpa adanya koloni yang muncul (Munfaati *et al*, 2015).

### 3.5.12 Uji *In Silico*

#### 1. Uji Prediksi PASS (*Prediction of Activity for Substances*)

Analisis PASS *Prediction* dilakukan untuk melihat potensi senyawa aktif bunga telang biru sebagai *antibacterial*. Analisis PASS dilakukan dengan masuk pada laman <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/> dan pilih *go for prediction* klik *predict new compound*. Input sruktur 2D senyawa aktif pada bagian *MOL File* kemudian klik *get prediction*. Hasil dari analisis PASS ditunjukkan dengan nilai Pa (*Probable activity*) yang memiliki beberapa kategori yaitu:

$Pa < 0,5$  :Senyawa tidak memiliki potensi sebagai *antibacterial*

$0,5 < Pa < 0,7$ :Senyawa memiliki potensi sebagai *antibacterial* tetapi tidak sebanding dengan agen farmaseutikal pada umumnya

$Pa > 0,7$  :Senyawa memiliki potensi sebagai *antibacterial* dan sebanding dengan agen farmaseutikal pada umumnya

## 2. Analisis Karakter Farmakokinetik

Analisis karakter farmakokinetik dilakukan untuk mengetahui sifat dari struktur kimia senyawa aktif bunga telang biru yang berhubungan dengan kemampuan bioavailabilitas oral. Analisis karakter farmakokinetik menggunakan *software online SwissADME* melalui <http://www.swissadme.ch/>. Struktur *canonical smiles* diunggah pada *software online SwissADME* untuk dianalisis karakter farmakokinetiknya.

## 3. Preparasi Ligan

Preparasi ligan dalam *molecular docking* bertujuan untuk optimasi ligan sehingga didapatkan struktur yang lebih stabil. Struktur 3D senyawa aktif bunga telang biru yang didapatkan dari *PubChem* dengan format penyimpanan SDF dipreparasi menggunakan *software PyRx* melalui *import chemical table file* dan ditambahkan ligan uji beserta *native ligand* yang telah disimpan. Optimasi ligan uji dilakukan dengan diperkecil ukuran ligan melalui *minimize* kemudian *convert to autodock* ligan.

## 4. Preparasi Protein Reseptor

Preparasi protein reseptor dilakukan untuk memastikan bahwa proses *docking* berjalan antara ligan dengan reseptor, tanpa adanya molekul yang tidak dibutuhkan seperti H<sub>2</sub>O. Struktur 3D *E. coli* ESBL yang didapatkan dari *Protein Data Bank* dipreparasi dengan memisahkan protein dengan molekul lain menggunakan *software PyMOL*. Preparasi selanjutnya dilakukan dengan dieliminasi molekul H<sub>2</sub>O pada protein sehingga dapat dipastikan interaksi hanya terjadi antara protein dengan ligan uji (Yuan *et al.*, 2017).

### 5. Penambatan Molekuler (*Molecular Docking*)

Penambatan molekuler bertujuan untuk mengetahui interaksi antara reseptor dengan ligan. Hasil *molecular docking* ditunjukkan dengan nilai energi bebas atau *binding affinity* dari ikatan yang terbentuk. Senyawa ligan uji dan *native ligand* yang telah dioptimasi ditambahkan pada *E. coli* ESBL tanpa *native ligand*-nya menggunakan *software* PyRx Autodock Vina. Proses *docking* dilakukan dengan menggunakan *grid box* hasil metode yang telah valid (X: 12.126517, Y: 33.017586, dan Z: 15.203517). Validasi metode *docking* dilakukan dengan parameter RMSD (*Root Mean Square Deviation*) untuk mengetahui hasil validasi terhadap hasil *docking*. Hasil *docking* disimpan dengan format PDB dan nilai *binding affinity* disimpan dengan format CSV.

### 6. Visualisasi Hasil *Molecular Docking*

Visualisasi hasil *molecular docking* dilakukan dengan *software* PyMOL dan *Discovery Studio* untuk mengetahui *binding pose* antara reseptor dengan ligan. Visualisasi dilakukan dengan input file hasil *docking* pada *software* PyMOL dan *Discovery Studio*

## 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh pada uji *in vitro* dianalisis secara statistik dengan diuji homogenitas dan normalitas. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui data yang dianalisis memiliki distribusi yang normal atau tidak. Data terdistribusi normal apabila nilai signifikan  $> \alpha$  (0,05) sedangkan data dianggap tidak terdistribusi normal apabila nilai signifikan  $< \alpha$  (0,05). Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui sama atau tidak varian pada beberapa populasi. Data dianggap

tidak homogen apabila nilai signifikan  $< \alpha$  (0,05) sedangkan data dianggap homogen apabila nilai signifikan  $> \alpha$  (0,05) (Sulisetijono, 2016). Data yang berdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *one-way Analysis of Varians* (ANOVA) pada program *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versi 25. Hasil analisis data dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) atau BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan bermakna pada setiap perlakuan.

Analisis data pada uji *in silico* digunakan senyawa aktif bunga telang biru dengan ketentuan karakter sebagai berikut:

1. Memiliki nilai kelarutan dalam air dengan rentang  $-6 < \text{Log S} < 0$ .
2. Memiliki nilai  $P_a$  (*Probable activity*)  $> P_i$  (*Probable inactivity*) dalam uji PASS sebagai *antibacterial*.
3. Memiliki nilai energi bebas (*binding affinity*)  $\leq -7$ .
4. Hasil interaksi dengan reseptor *E. coli* ESBL memiliki residu asam amino yang sama dengan salah satu atau lebih residu asam amino serine 70/64/237 dan lysine 67/73.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Kadar Total Asam, pH, dan Antosianin Total Kombucha Bunga Telang Biru

Analisis yang dilakukan pada kombucha bunga telang biru dengan penambahan gula berbagai konsentrasi (20%, 30%, 40%, dan 50%) yaitu nilai total asam (%), pH, dan antosianin total (mg/L). Hasil analisis didapatkan pada tabel 4.1. dibawah ini.

**Tabel 4. 1. Nilai total asam, pH, dan antosianin total pada kombucha bunga telang biru**

<b>Konsentrasi Gula</b>	<b>Total Asam (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Antosianin Total (mg/L)</b>
20%	1,02375 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,525 ± 0,17 <sup>a</sup>	44,9037 ± 7,06 <sup>a</sup>
30%	1,08675 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,137 ± 0,11 <sup>b</sup>	55,2119 ± 3,95 <sup>b</sup>
40%	1,11037 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,837 ± 0,05 <sup>c</sup>	68,9089 ± 5,70 <sup>c</sup>
50%	1,46475 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,585 ± 0,06 <sup>d</sup>	88,3955 ± 5,71 <sup>d</sup>

Keterangan: nilai dinyatakan dalam rata-rata ± standar deviasi (M ± SD), huruf dibelakang angka yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan pada perlakuan

Hasil statistik berdasarkan analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi gula pada kombucha bunga telang biru memiliki pengaruh yang berbeda signifikan pada total asam, pH, dan kadar antosianin total dengan nilai sig (0,00) <  $\alpha$  (0,05) (Lampiran 11). Perlakuan penambahan konsentrasi gula berpengaruh terhadap peningkatan nilai total asam yang dihasilkan pada kombucha bunga telang biru. Rata-rata total asam yang dihasilkan pada kombucha yang difermentasi selama 14 hari berkisar antara 1,02375-1,46475%. Rentang nilai tersebut masih berada pada kisaran standar mutu

internasional mengenai nilai total asam kombucha yang ditetapkan oleh *Draft Uganda Standard 2037* yaitu  $\leq 2\%$  (Uganda National Bureau of Standards, 2018). Total asam yang dihasilkan pada kombucha bunga telang biru pada umumnya (konsentrasi gula 10%) menurut Wongthai *et al.* (2021) sebesar 0,97%. Peningkatan total asam pada kombucha seiring dengan penambahan konsentrasi gula pada kombucha bunga telang biru. Konsentrasi gula yang meningkat mengakibatkan semakin besar jumlah nutrisi untuk aktivitas metabolisme mikroba sehingga total asam yang dihasilkan semakin banyak. Hal tersebut berkaitan dengan aktivitas SCOBY dalam merombak sukrosa menjadi asam asetat.

Proses fermentasi dimulai dengan khamir yang menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim invertase dan menghasilkan etanol melalui glikolisis. Di sisi lain, bakteri menggunakan glukosa dengan menghasilkan asam glukonat dan etanol untuk menghasilkan asam asetat. Kehadiran asam dapat merangsang khamir untuk menghasilkan etanol yang kemudian digunakan oleh bakteri untuk tumbuh dan menghasilkan lebih banyak asam asetat. Menurut Kurniawan *et al.* (2017) peningkatan konsentrasi gula menyebabkan tingginya perombakan gula menjadi alkohol dan perombakan alkohol menjadi asam organik sehingga terjadi peningkatan total asam yang dihasilkan.

Peningkatan total asam yang terjadi seiring dengan penambahan konsentrasi gula yang diberikan juga berpengaruh terhadap penurunan nilai pH pada kombucha bunga telang biru. Rata-rata nilai pH yang dihasilkan dalam kombucha yaitu berkisar antara 2,585-3,525. Rentang nilai pH tersebut berada pada standar mutu mengenai keamanan kombucha yang ditetapkan oleh *BC Centre for Disease*

*Control* (2015) yaitu pH kombucha harus berkisar antara 2,5-4,2. pH yang dihasilkan pada kombucha bunga telang biru pada umumnya (konsentrasi gula 10%) menurut Wongthai *et al.* (2021) sebesar 3,7. Penurunan pH pada kombucha dapat disebabkan oleh peningkatan konsentrasi asam organik yang dihasilkan selama proses fermentasi. Akumulasi hasil metabolisme mikroba pada saat fermentasi yaitu zat asam organik dan peningkatan proton  $H^+$  dapat menyebabkan penurunan pH dan rasa menjadi asam (Kumar & Joshi, 2016).

Peningkatan konsentrasi gula yang ditambahkan pada kombucha bunga telang biru berpengaruh terhadap kadar antosianin total yang dihasilkan. Tabel 4.1. menunjukkan semakin tinggi konsentrasi gula yang ditambahkan pada kombucha menyebabkan peningkatan kadar antosianin yang dihasilkan. Rata-rata kadar antosianin yang dihasilkan berkisar antara 44,9037-88,3955 mg/L. Penelitian Wiyantoko & Astuti (2020) menyebutkan bahwa ekstrak etanol bunga telang biru segar memiliki kadar antosianin total sebesar 14,2775 mg/L sedangkan ekstrak bunga telang biru kering memiliki kadar antosianin total sebesar 30,57 mg/L (Vuong *et al.*, 2021). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa antosianin total yang dihasilkan dari ekstrak bunga telang biru lebih rendah daripada antosianin total yang dihasilkan pada kombucha bunga telang biru.

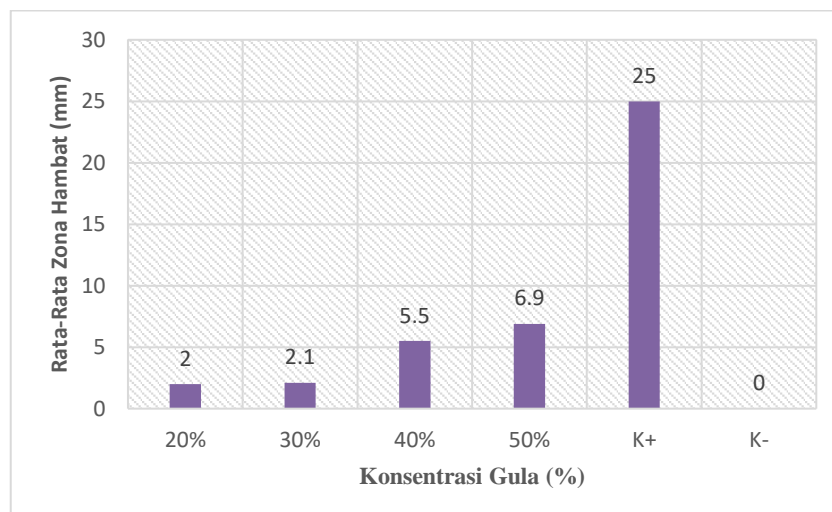
Hal tersebut berkaitan dengan peningkatan total asam kombucha bunga telang biru. Peningkatan kadar total asam kombucha dapat membebaskan ion  $H^+$  (hidrogen) dalam medium dan menyebabkan sel vakuola terdenaturasi sehingga meningkatkan ekstraksi antosianin (Unawahi *et al.*, 2022). Ekstraksi senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid dianjurkan dilakukan pada keadaan asam sehingga membran sel tanaman dapat terdenaturasi (Robinson, 1995).



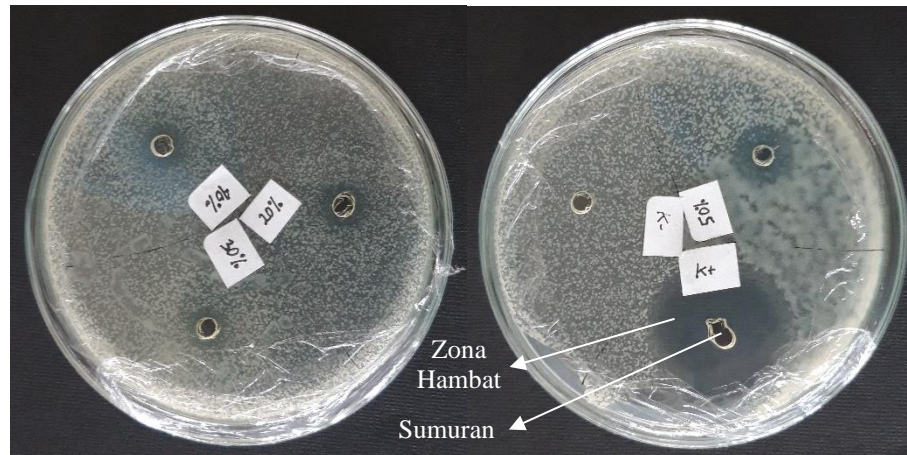
## 4.2 Aktivitas Antibakteri Kombucha Bunga Telang Biru terhadap *Escherichia coli* ESBL

### 4.2.1 Uji Aktivitas Antibakteri Kombucha Bunga Telang Biru terhadap *Escherichia coli* ESBL

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan kombucha bunga telang biru dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ESBL. Uji konfirmasi bakteri *E. coli* ESBL yang dilakukan terdiri dari pewarnaan gram, uji TSIA, dan uji pemastian *E. coli* ESBL. Bakteri uji yang digunakan merupakan *E. coli* ESBL berdasarkan uji konfirmasi yang dilakukan (Lampiran 15), ditunjukkan pada zona hambat bakteri terhadap ceftazidime sebesar 3 mm. Hasil positif bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBL apabila zona hambat yang dihasilkan pada ceftazidime sebesar  $\leq 22$  mm (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016). Hasil uji aktivitas antibakteri kombucha bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL ditunjukkan pada gambar di bawah ini.



**Gambar 4. 1. Korelasi konsentrasi gula pada kombucha bunga telang biru terhadap zona hambat *E. coli* ESBL**



**Gambar 4. 2. Zona hambatan kombucha bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL**

Gambar 4.1. menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambatan terbesar yaitu 6.9 mm pada kombucha bunga telang biru dengan penambahan konsentrasi gula sebanyak 50%. Rata-rata diameter zona hambatan terkecil terdapat pada konsentrasi gula 20% sebesar 2 mm. Berdasarkan kategori zona hambatan menurut Davis & Stout (1971), kombucha bunga telang biru pada konsentrasi gula 20% dan 30% memiliki daya hambatan lemah terhadap pertumbuhan *E. coli* ESBL. Kombucha bunga telang biru pada konsentrasi gula 40% dan 50% memiliki daya hambatan sedang terhadap pertumbuhan *E. coli* ESBL. Kontrol positif (meropenem) memiliki daya hambatan sangat kuat terhadap pertumbuhan *E. coli* ESBL. Kontrol negatif tidak memperlihatkan adanya daya hambatan pada bakteri *E. coli* ESBL.

Meropenem merupakan antibiotik kelas karbapenem yang umumnya digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri multi resisten. Mekanisme kerja karbapenem termasuk meropenem yaitu dengan mengganggu sintesis pada dinding sel bakteri. Meropenem menghambat reaksi transpeptidasi sehingga sintesis peptidoglikan juga terhambat, selanjutnya terjadi inaktivasi inhibitor

enzim autolitik pada dinding sel, sehingga enzim litik teraktivasi dan dapat menyebabkan lisis bakteri (Dharmawan & Layanto, 2018).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi gula kombucha maka semakin besar diameter zona hambat yang dihasilkan. Hal tersebut dikarenakan konsentrasi gula yang tinggi lebih banyak menghasilkan asam organik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Tabel 4.1.). Kandungan asam organik yang terdapat pada kombucha didominasi oleh asam asetat yang berpotensi merusak struktur bilayer lipid bakteri.

Asam asetat dapat dengan mudah masuk ke dalam sel bakteri baik secara pasif maupun melalui adanya suatu pembawa (*carrier-mediated transport*). Asam asetat yang dihasilkan dalam kombucha melepaskan proton-proton  $H^+$  (Naidu, 2000). Proton-proton  $H^+$  masuk ke dalam sitoplasma bakteri patogen. Tingginya jumlah proton intraseluler menyebabkan penurunan pH intraseluler dan sitoplasma akan berada dalam kondisi asam. Proses tersebut menyebabkan denaturasi protein, mempengaruhi metabolisme bakteri, dan meningkatkan energi bakteri untuk mengeluarkan kelebihan proton  $H^+$  di dalam sitoplasma sehingga dapat menyebabkan kematian bakteri akibat kehilangan energi (Kumar & Joshi, 2016).

Aktivitas antibakteri kombucha bunga telang biru juga dapat terjadi karena adanya kandungan senyawa aktif bunga telang biru salah satunya yaitu antosianin. Mekanisme senyawa antosianin sebagai antibakteri yaitu dengan merusak membran dan menurunkan aktivitas ATP (*adenosine triphosphate*) dan AKP (*alkaline phosphate*). ATP merupakan sumber energi yang digunakan dalam semua proses metabolisme sel. ATP juga berperan penting pada sintesis asam

nukleat. Senyawa antosianin diketahui dapat menurunkan aktivitas ATP sehingga dapat menyebabkan metabolisme pada bakteri terhambat (Sun *et al.*, 2018). AKP merupakan enzim yang terletak di periplasma yaitu ruang antara membran sitoplasma bagian dalam dan membran luar bakteri. AKP berperan penting dalam menjaga bakteri dari proses inaktivasi serta denaturasi yang dapat menyebabkan bakteri mati. Selain itu, AKP juga berperan dalam menghasilkan gugus fosfat bebas untuk penyerapan nutrisi bagi bakteri. Antosianin diketahui dapat menurunkan hingga inaktivasi AKP yang dapat menghambat proses diferensiasi sel (Lacombe *et al.*, 2010).

Penambahan konsentrasi gula pada kombucha tidak selalu menyebabkan kenaikan daya hambat pada bakteri patogen. Mikroba yang memiliki peranan dalam proses fermentasi memiliki batas optimal dalam pemanfaatan gula sebagai energi sehingga tidak semua gula dapat dikonversi menjadi produk metabolit. Penelitian Rizal *et al.* (2019) menunjukkan penambahan konsentrasi sukrosa sebesar 65% (b/v) menurunkan efektivitas daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli*. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi gula dibawah 65% merupakan konsentrasi optimum bagi pertumbuhan bakteri. Konsentrasi gula yang terlalu tinggi menyebabkan penurunan jumlah mikroba sehingga aktivitas mikroba dalam proses fermentasi juga menurun. Aktivitas antibakteri yang berasal dari minuman probiotik dipengaruhi oleh jumlah sel mikroba dan aktivitasnya dalam menghambat bakteri patogen (Júnior & Batista, 2009).

Analisis statistik data diameter zona hambat kombucha bunga telang biru menggunakan uji *One Way ANOVA* yang memiliki syarat yaitu data berdistribusi normal dan mempunyai varian homogen. Hasil uji normalitas data diameter zona

hambat menunjukkan data berdistribusi normal dengan nilai signifikansi  $p > 0,05$  (Lampiran 2). Data diameter zona hambat tidak homogen atau tidak memiliki variasi yang sama dengan nilai signifikansi  $(0,018) < \alpha (0,05)$  (Lampiran 2) sehingga dilakukan uji nonparametrik *Kruskal wallis* karena uji parametrik *One Way ANOVA* tidak terpenuhi. Tujuan dari uji nonparametrik *Kruskal wallis* yaitu mengetahui perbedaan secara nonparametrik antara dua atau lebih variabel bebas terhadap variabel terikat. Hasil uji nonparametrik *Kruskal wallis* menunjukkan nilai signifikansi  $(0,001) < \alpha (0,05)$  yang berarti terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan.

#### **4.2.2 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kombucha Bunga Telang Biru terhadap *Escherichia coli* ESBL**

Uji konsentrasi hambat minimum (KHM) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terendah dari kombucha bunga telang biru dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* ESBL. Uji KHM dilakukan dengan mengamati pertumbuhan bakteri *E. coli* ESBL sebelum dan sesudah inkubasi dilihat dari perbedaan kekeruhan menggunakan spektrofotometer. Perbedaan kekeruhan dilihat dengan penurunan nilai *optical density* yang dihasilkan sesudah inkubasi (Lampiran 7). Hasil uji konsentrasi hambat minimum (KHM) ditunjukkan pada tabel 4.2.

**Tabel 4. 2. Hasil uji KHM kombucha bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL**

Mikroba Uji	Konsentrasi	Ulangan			
		1	2	3	4
<i>E. coli</i> ESBL	20%	-	-	-	-
	30%	-	-	-	-
	40%	+	+	+	+
	50%	+	+	+	+
	K+	+	+	+	+
	K-	-	-	-	-

Keterangan: (+): terjadi penurunan nilai absorbansi  
 (-): tidak terjadi penurunan nilai absorbansi

Data hasil uji KHM menunjukkan bahwa nilai KHM kombucha bunga telang biru ditentukan pada konsentrasi gula 40% yang ditunjukkan pada penurunan nilai *optical density* (OD) atau absorbansi sesudah inkubasi (Lampiran 7) dan berarti pada konsentrasi tersebut pertumbuhan bakteri dapat dihambat. Nilai positif yang terdapat pada tabel 4.2. menunjukkan bahwa terdapat penurunan nilai *optical density* (OD) atau absorbansi sesudah inkubasi. Penurunan nilai absorbansi setelah inkubasi yang juga ditandai dengan semakin jernihnya larutan atau tingkat kekeruhan yang semakin menurun (Lampiran 17) menunjukkan tidak adanya sel bakteri hidup sehingga pada titik konsentrasi tersebut ditentukan sebagai nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) (Astutiningsih *et al.*, 2014). Panjang gelombang yang digunakan untuk melihat nilai OD yaitu 600 nm. Panjang gelombang 600 nm digunakan karena sel-sel dapat terbaca pada panjang gelombang tersebut (American Public Health Association, 1998).

Tabel 4.2 menunjukkan semakin tinggi konsentrasi gula pada kombucha (40% dan 50%) menghasilkan peningkatan kejernihan pada larutan sesudah inkubasi yang ditunjukkan dengan penurunan nilai absorbansi larutan sesudah inkubasi (Lampiran 7). Semakin tinggi konsentrasi gula yang digunakan pada

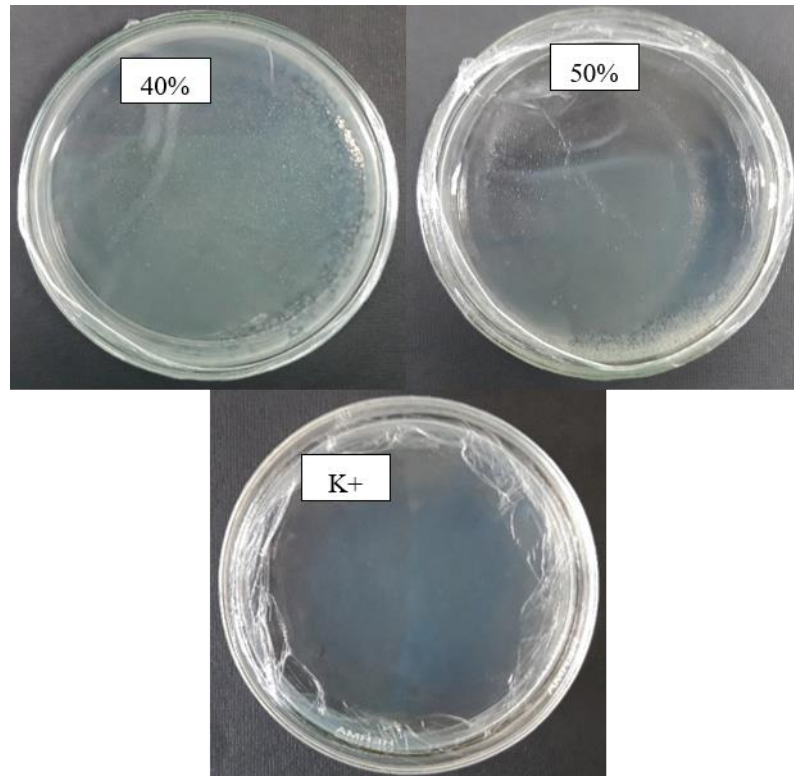
kombucha menyebabkan besarnya zona hambat yang dihasilkan (Gambar 4.1). Besarnya zona hambat yang dihasilkan menyebabkan penurunan kekeruhan larutan sesudah inkubasi. Semakin jernih suatu larutan menunjukkan bahwa pada larutan tersebut tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

#### 4.2.3 Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) Kombucha Bunga Telang Biru terhadap *Escherichia coli* ESBL

Penentuan nilai konsentrasi bunuh minimum (KBM) dilakukan dengan mensubkultur 200  $\mu$ l hasil positif KHM kombucha bunga telang biru pada media agar dengan metode *pour plate*. KBM merupakan konsentrasi agen antimikroba terendah yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroorganisme pada media kultur (Owuama, 2017). *Total Plate Count* (TPC) merupakan metode untuk menganalisis jumlah total mikroorganisme (fungi, khamir, bakteri) dalam suatu media kultur. Jumlah koloni yang dihitung dalam cawan apabila lebih dari 300 koloni dinyatakan terlalu banyak untuk dihitung (TBUD) atau *too numerous to count* (TNTC) (Mailoa *et al.*, 2017). Hasil uji KBM kombucha bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL ditunjukkan pada tabel 4.3.

**Tabel 4. 3. Hasil uji KBM kombucha bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL**

<b>Mikroba Uji</b>	<b>Konsentrasi</b>	<b>Jumlah Mikroba Hidup (CFU/mL)</b>
<i>E. coli</i> ESBL	40%	$8,75 \times 10^3$
	50%	$4,15 \times 10^3$
	K+	0



**Gambar 4. 3. Total Plate Count (TPC)**

Data hasil uji KBM menunjukkan bahwa kombucha bunga telang biru tidak memiliki kemampuan dalam membunuh bakteri *E. coli* ESBL baik pada konsentrasi gula 40% maupun 50%. Hal tersebut ditunjukkan dengan masih tumbuhnya bakteri *E. coli* ESBL pada media agar. Jumlah bakteri *E. coli* ESBL yang masih bertahan hidup pada kombucha bunga telang biru dengan konsentrasi gula 40% sebanyak  $8,75 \times 10^3$ , dan jumlah bakteri *E. coli* ESBL yang masih bertahan hidup pada kombucha bunga telang biru dengan konsentrasi gula 50% sebanyak  $4,15 \times 10^3$ . Hasil kontrol positif pada uji KBM menunjukkan kemampuan dalam membunuh bakteri *E. coli* ESBL. Hal tersebut ditandai dengan tidak ada pertumbuhan bakteri pada media agar.



### 4.3 *In Silico*

#### 4.3.1 Skrining Fitokimia Kombucha Bunga Telang Biru

Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui senyawa aktif yang terdapat di dalam kombucha bunga telang biru. Skrining fitokimia juga dilakukan sebagai konfirmasi bahwa senyawa aktif bunga telang biru pada uji *in silico* benar adanya. Senyawa aktif yang diuji dalam skrining fitokimia kombucha bunga telang biru yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Hasil skrining fitokimia kombucha bunga telang biru ditunjukkan pada tabel 4.4.

**Tabel 4. 4. Hasil skrining fitokimia kombucha bunga telang biru secara kualitatif**

<b>Senyawa Fitokimia</b>	<b>Hasil</b>	<b>Keterangan</b>
Alkaloid	+	Terbentuk endapan coklat kemerahan
Flavonoid	+	Terbentuk jingga keabuan
Saponin	+	Terbentuk busa stabil
Tanin	-	Tidak terbentuk hijau kehitaman

Keterangan: (+): mengandung senyawa yang diuji  
 (-): tidak mengandung senyawa yang diuji

Hasil uji fitokimia secara kualitatif kombucha bunga telang biru mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tidak mengandung senyawa tanin. Skrining fitokimia pada penelitian Abdilah *et al.* (2022) menunjukkan bahwa kombucha bunga telang biru tidak mengandung senyawa tanin tetapi mengandung senyawa saponin, alkaloid, dan flavonoid. Penelitian Rezaldi *et al.* (2022) juga menunjukkan bahwa skrining fitokimia kombucha bunga telang biru mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tidak mengandung senyawa tanin.

Uji identifikasi flavonoid dilakukan dengan penambahan serbuk Mg dan HCl pekat pada sampel. Perubahan warna sampel menjadi jingga keabuan menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Pada keadaan asam, HCl bereaksi dengan Mg dan membentuk ion  $Mg^{2+}$  + gas  $H^2$ . Adanya gelembung pada sampel menunjukkan terbentuknya gas  $H^2$ . Ion  $Mg^{2+}$  berikatan dengan flavonoid dan menimbulkan perubahan warna kuning, jingga keabuan, hingga merah (Nugrahani *et al.*, 2016). Flavonoid yang terkandung dalam bunga telang biru seperti kaempferol, robinin, clitorin, quercetin, hingga antosianin yang khas yaitu ternatin (Turnos, 2021).

Hasil uji alkaloid menunjukkan bahwa kombucha bunga telang biru mengandung senyawa alkaloid. Hal tersebut dapat dilihat dari terbentuknya endapan cokelat kemerahan pada pereaksi Dragendorff dan Wagner, akan tetapi pada pereaksi Mayer tidak terbentuk endapan putih. Sampel dinyatakan mengandung senyawa alkaloid apabila menunjukkan hasil positif minimal pada 2 pereaksi (Meigaria *et al.*, 2016). Endapan cokelat kemerahan terbentuk karena nitrogen yang terdapat pada alkaloid membentuk ikatan kovalen dengan ion  $K^+$  (kalium tetraiodobismutat) sehingga membentuk kompleks alkaloid-kalium (Marliana *et al.*, 2005). Alkaloid yang terdapat pada bunga telang biru seperti cephalotaxine (Manivannan, 2019).

Uji identifikasi saponin dilakukan dengan metode *frothing test* yaitu sampel dikocok hingga 1 menit dan dihasilkan busa yang stabil selama 10 menit. Hal tersebut menunjukkan bahwa kombucha bunga telang biru mengandung senyawa saponin. Saponin dapat membentuk misel saat dikocok karena terdapat gugus non polar dan polar yang bersifat aktif permukaan. Kondisi yang terlihat berbusa yaitu

karena gugus non polar menghadap ke dalam dan gugus polar menghadap keluar (Sangi *et al.*, 2008).

#### 4.3.2 Analisis Karakter Farmakokinetik Senyawa Aktif Bunga Telang Biru

Analisis karakter farmakokinetik suatu senyawa aktif merupakan hal yang sangat penting dalam penemuan suatu senyawa obat baru. Sifat dan karakteristik suatu senyawa bioaktif kandidat obat lebih mudah diperkirakan dengan *in silico* karena bebas dari limbah kimia dan dalam waktu yang cepat. Senyawa aktif bunga telang biru yang dianalisis yaitu cephalotaxine, clitorin, quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside) dan ternatin, dimana senyawa clitorin dan ternatin merupakan senyawa khas yang terdapat dalam bunga telang biru. Hasil analisis karakter farmakokinetik senyawa aktif bunga telang biru ditunjukkan pada tabel 4.5.

**Tabel 4. 5. Karakter farmakokinetik senyawa aktif bunga telang biru**

<b>Senyawa Aktif</b>	<b>Solubility</b>	<b>PAINS</b>
Cephalotaxine	-2,05	0 alert
Clitorin	-2,86	0 alert
Quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside)	-3,10	1 alert
Ternatin	-4,24	0 alert
Meropenem (Kontrol)	-0,33	0 alert

Analisis karakter farmakokinetik yang dilakukan secara *in silico* terdiri dari solubilitas air, dan PAINS. Solubilitas air merupakan hal yang penting untuk obat dengan pemberian secara oral. Solubilitas air merupakan faktor kunci yang mempengaruhi bioavailabilitas oral obat. Rentang solubilitas air berada pada  $-6 < \text{Log S} < 0$ . Nilai Log S yang semakin menuju ke 0 menunjukkan solubilitas air yang tinggi. Senyawa cephalotaxine (-2,05) dan clitorin (-2,86) memiliki

solubilitas air lebih tinggi daripada senyawa ternatin (-4,24) dan quercetin 3-(6''-malonylneoheperidoside) (-3,10). Menurut Wang *et al.* (2007) solubilitas suatu senyawa pada air yang tinggi menyebabkan tingginya gradien konsentrasi senyawa berdifusi sehingga proses pelepasan senyawa dari matriks atau proses disolusi semakin cepat. Hal tersebut menyebabkan meningkatnya bioavailabilitas suatu senyawa.

Selain berat solubilitas air, aspek kimia obat seperti PAINS juga penting dalam penemuan suatu senyawa obat baru. PAINS (*Pan Assay Interference Compounds or frequent hitters or promiscuous compounds*) merupakan molekul yang menunjukkan respon kuat dalam pengujian terlepas dari target protein. PAINS berfungsi dalam prediksi identifikasi struktur atau fragmen suatu senyawa yang dapat menyebabkan masalah dalam kemiripan obat (*drug likeness*) (Mahanthesh *et al.*, 2020). Tabel 4.5. menunjukkan bahwa senyawa quercetin 3-(6''-malonylneoheperidoside) memiliki 1 *alert* yang memperlihatkan bahwa terdapat fragmen atau struktur senyawa quercetin 3-(6''-malonylneoheperidoside) yang tidak stabil secara metabolik dan berpotensi toksik.

#### **4.3.3 Prediksi PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*)**

Prediksi potensi aktivitas senyawa bunga telang biru sebagai *antibacterial* dilakukan menggunakan *software online* PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*). Analisis PASS didasarkan pada hubungan antara struktur dari suatu senyawa dengan aktivitas biologisnya atau biasa disebut SAR (*Structure Activity Relationship*) (Filimonov *et al.*, 2014). Hasil prediksi PASS senyawa aktif bunga telang biru sebagai *antibacterial* ditunjukkan pada tabel 4.6.

**Tabel 4. 6. Hasil prediksi PASS senyawa aktif bunga telang biru**

<b>Senyawa Aktif</b>	<b>Pa</b>	<b>Pi</b>
Cephalotaxine	0,259	0,129
Clitorin	0,703	0,004
Quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside)	0,679	0,005
Ternatin	0,508	0,018
Meropenem (Kontrol)	0,789	0,002

Keterangan : Pa (*Probable activity*), Pi (*Probable inactivity*)

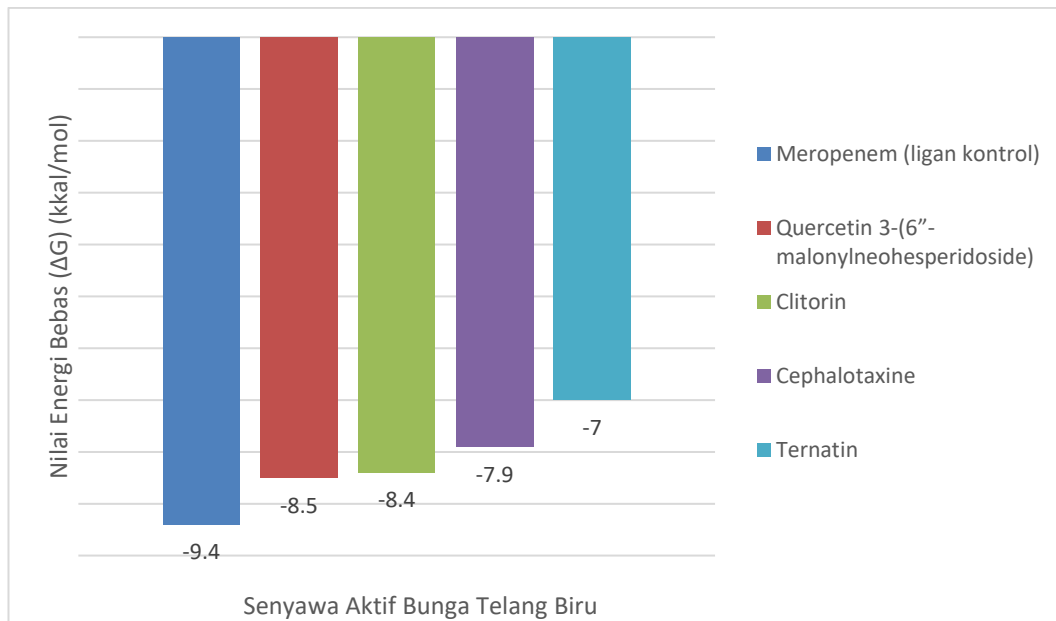
Hasil analisis PASS ditunjukkan dengan nilai Pa dan Pi. Nilai Pa menunjukkan kemungkinan senyawa untuk aktif dalam melaksanakan aktivitas biologi (*antibacterial*) secara eksperimental, sedangkan nilai Pi merupakan kebalikan dari nilai Pa. Senyawa yang memiliki nilai Pa > nilai Pi dapat diprediksikan memiliki potensi aktivitas biologi yaitu sebagai *antibacterial*. Semakin tinggi selisih nilai antara Pa dan Pi serta semakin tinggi nilai Pa maka semakin besar kemungkinan suatu senyawa sebagai antibakteri secara eksperimental (Ivanov *et al.*, 2018).

Hasil prediksi PASS menunjukkan senyawa aktif bunga telang biru memiliki aktivitas antibakteri karena memiliki selisih nilai Pa dan Pi yang tinggi dan nilai Pa > Pi. Akan tetapi, senyawa cephalotaxine memiliki nilai Pa < 0,5 (0,259) yang tergolong rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa cephalotaxine kemungkinan tidak memiliki kemampuan sebagai *antibacterial*. Menurut Lagunin *et al.* (2000) jika senyawa memiliki nilai Pa < 0,5 kemungkinan tidak memiliki kemampuan dalam suatu aktivitas biologi dan senyawa dengan nilai Pa > 0,7 kemungkinan memiliki kemampuan dalam aktivitas biologi dan sebanding dengan agen farmaseutikal yang telah dikenal.

#### 4.3.4 *Molecular Docking*

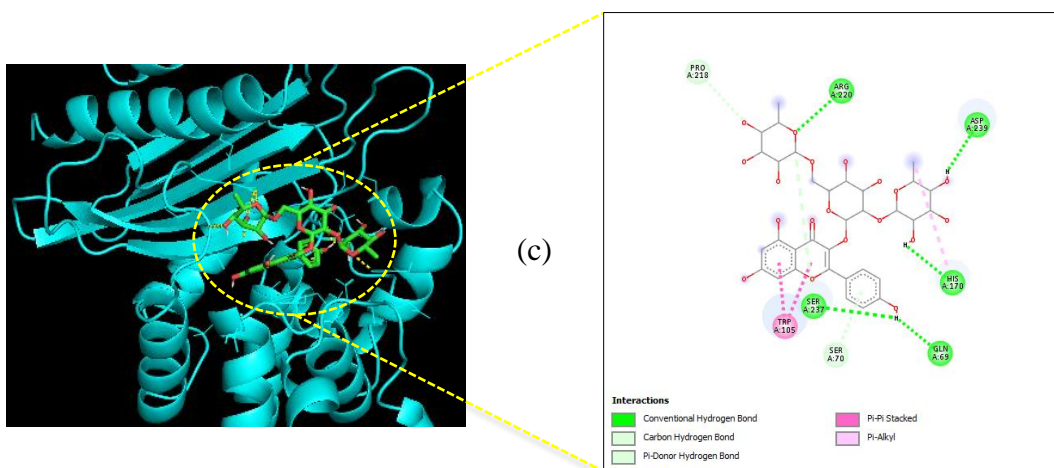
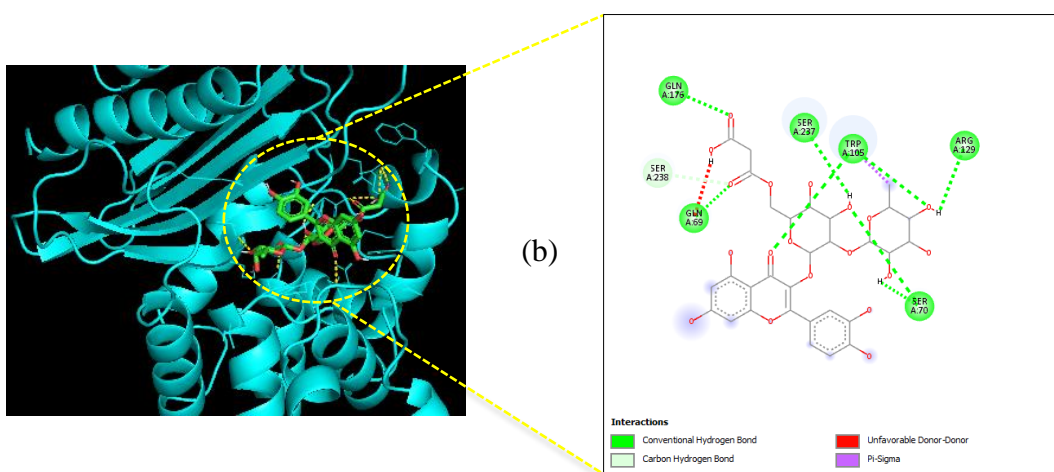
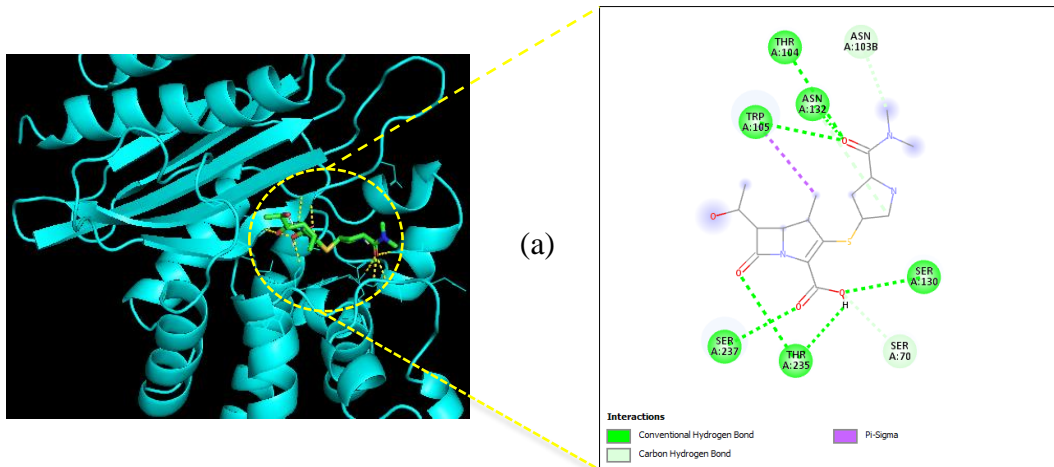
Ligan yang digunakan pada proses *docking* yaitu senyawa aktif dari bunga telang biru dan meropenem sebagai ligan kontrol. Diinteraksikan ligan-ligan tersebut dengan reseptor yaitu *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase* (PDB: 6NVU). Prinsip kerja utama dari *molecular docking* yaitu *scoring*. Tujuan *scoring* yaitu untuk menghitung energi bebas yang berhubungan dengan protein dan ligan dalam pembentukan interaksi protein-ligan.

Nilai energi bebas ( $\Delta G$ ) hasil proses *docking* menunjukkan kapasitas sistem termodinamika dalam melakukan kerja maksimum pada suhu dan tekanan yang konstan untuk mengetahui spontanitas dan tidaknya jalan suatu reaksi. Kondisi ligan untuk bereaksi dengan reseptor secara spontan tanpa memerlukan dan melepaskan energi ditunjukkan pada nilai negatif  $\Delta G$ . Nilai negatif  $\Delta G$  menentukan stabilitas kompleks protein dengan ligan. Semakin tinggi spontanitas ligan dalam berikatan dengan reseptor maka ikatan yang dihasilkan juga semakin stabil, ditunjukkan dengan nilai  $\Delta G$  yang semakin rendah (negatif) (Du *et al.*, 2016). Hasil *docking* senyawa aktif bunga telang biru terhadap ESBL ditunjukkan pada gambar 4.4.

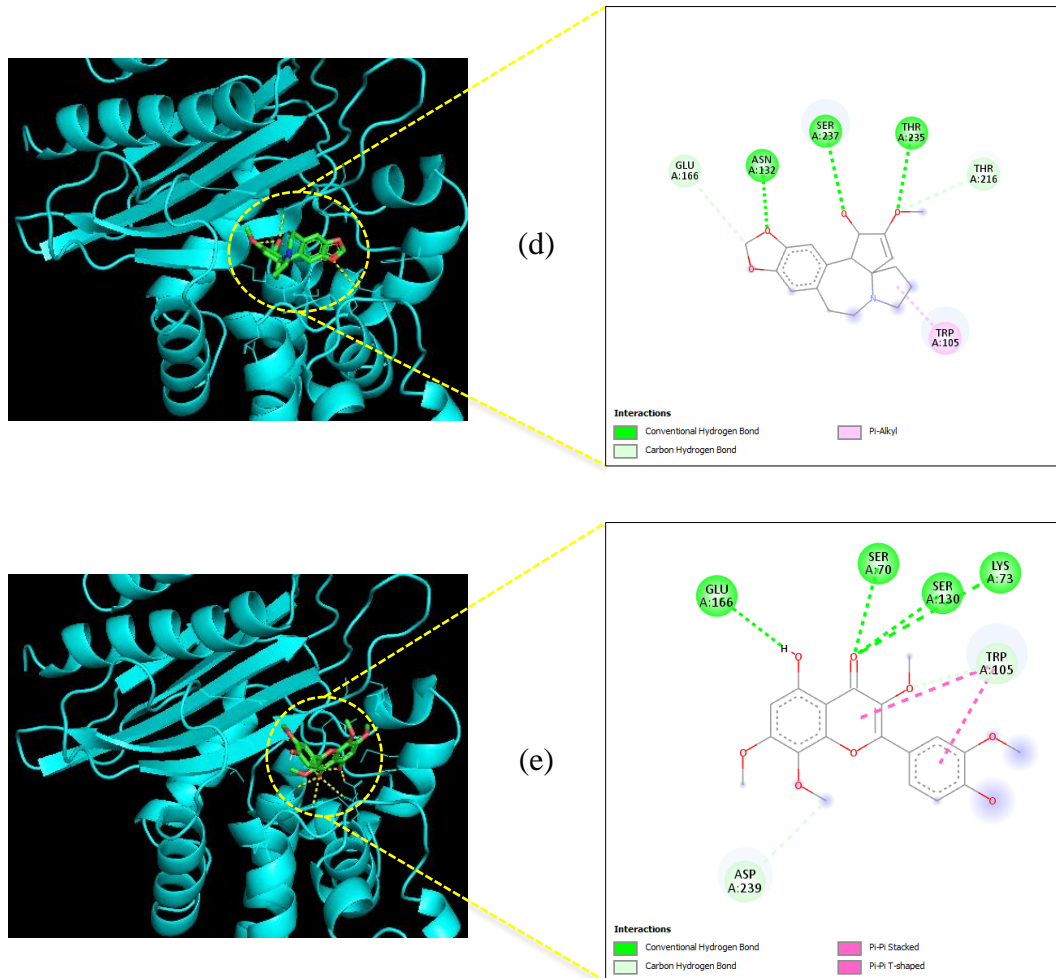


**Gambar 4. 4. Nilai energi bebas ( $\Delta G$ ) hasil *molecular docking* senyawa aktif bunga telang biru dengan ESBL**

Hasil *molecular docking* menunjukkan nilai energi bebas ( $\Delta G$ ) senyawa cephalotaxine, clitorin, quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside), dan ternatin secara berturut-turut yaitu -7.9 kkal/mol, -8.4 kkal/mol, -8.5 kkal/mol, -7 kkal/mol. Senyawa quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside) memiliki nilai  $\Delta G$  (-8,5 kkal/mol) terendah daripada senyawa aktif bunga telang biru yang lain dan mendekati nilai  $\Delta G$  meropenem (-9,4 kkal/mol) yang berfungsi sebagai ligan kontrol. Semakin rendah nilai  $\Delta G$  maka semakin baik stabilitas ikatan antara ligan dan reseptor karena ikatan yang terbentuk semakin kuat. Hasil *molecular docking* divisualisasikan menggunakan *software discovery studio* dan PyMOL untuk menemukan ikatan residu asam amino kemudian dianalisis apakah ligan memiliki residu asam amino yang terikat sama dengan ligan kontrol. Hasil visualisasi *molecular docking* ditunjukkan pada gambar 4.5.







**Gambar 4. 5. Visualisasi interaksi antara ligan dengan reseptor.** (a) meropenem (ligan kontrol), (b) quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside), (c) clitorin, (d) cephalotaxine, (e) ternatin

Visualisasi hasil interaksi antara meropenem dengan reseptor ESBL dengan nilai  $\Delta G$  -9,4 kkal/mol menunjukkan bahwa meropenem membentuk ikatan hidrogen yang berikatan pada residu asam amino Ser 237, Ser 130, Ser 70, Thr 235, Thr 104, Asn 132, Trp 105, dan Asn 103B pada sisi aktif ESBL. Menurut Tooke *et al.* (2019) residu katalitik kunci dari sisi aktif  $\beta$ -lactamase yang memiliki tanggung jawab untuk berikatan dengan substrat yaitu serine 70/64/237 dan lysine 67/73.

Senyawa quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside) yang memiliki nilai  $\Delta G$  terendah memiliki ikatan hidrogen pada asam amino yang sama dengan meropenem (ligan kontrol) yaitu Ser 237, Ser 70, dan Trp 105. Senyawa clitorin memiliki ikatan hidrogen pada asam amino yang sama dengan ligan kontrol yaitu Ser 237 dan Ser 70. Senyawa cephalotaxine memiliki ikatan hidrogen pada asam amino yang sama dengan ligan kontrol yaitu Ser 237, Thr 235, dan Asn 132. Senyawa ternatin juga memiliki ikatan hidrogen pada asam amino yang sama dengan ligan kontrol yaitu Ser 70, Ser 130, dan Trp 105. Apabila terdapat ikatan yang sama pada senyawa ligan dengan meropenem (ligan kontrol) maka posisi yang sama pada sisi aktif reseptor dapat ditempati oleh senyawa ligan tersebut sehingga berpotensi menyerupai meropenem yang berfungsi sebagai obat kontrol.

Mekanisme resistensi  $\beta$ -laktam dapat disebabkan oleh hidrolisis struktur inti (cincin  $\beta$ -laktam) dan mutasi pada saluran porin.  $\beta$ -laktamase mengkatalisis hidrolisis antibiotik golongan  $\beta$ -laktam dalam reaksi asilasi-deasilasi. Hidrolisis  $\beta$ -laktam oleh *E. coli* penghasil  $\beta$ -laktamase terjadi setelah pembentukan kompleks enzim-substrat prekovalen, reaksi asilasi dimulai melalui aktivasi serine yang dimediasi basa umum, yang kemudian berfungsi sebagai nukleofil untuk menyerang karbon karbonil dari cincin  $\beta$ -laktam untuk membentuk intermediet asil-enzim. Intermediet asil-enzim akan terdeasilasi oleh molekul air dan menyebabkan hidrolisis dan inaktivasi dari antibiotik  $\beta$ -laktam (Pemberton *et al.*, 2020). Meropenem sebagai obat kontrol memiliki rantai samping (*side chain*) hidroksietil yang dapat memberikan penghalang sterik untuk pendekatan molekul air sehingga tidak terjadi deasilasi dan hidrolisis antibiotik  $\beta$ -laktam (Papp-Wallace *et al.*, 2011).

Senyawa clitorin yang merupakan senyawa khas bunga telang biru dengan nilai  $\Delta G$  mendekati kontrol tidak memiliki struktur inti  $\beta$ -laktam sehingga tidak akan terpengaruh oleh mutasi saluran porin yang mencegah  $\beta$ -laktam mencapai *penicillin binding protein* (PBP) dan tidak akan dihidrolisis oleh  $\beta$ -laktamase. Pengikatan suatu ligan dengan reseptor hingga terjadi interaksi membutuhkan energi eksitasi. Menurut Lakhera *et al.* (2022) clitorin pada bunga telang biru memiliki energi eksitasi yang tinggi, hal tersebut mengarah pada tingginya kemampuan berikatan pada situs aktif suatu makromolekul.

Senyawa ternatin yang juga merupakan senyawa aktif bunga telang biru memiliki potensi dalam menghambat reseptor karena nilai energi bebas yang dihasilkan  $\leq -7$ . Senyawa ternatin memiliki ikatan yang sama dengan asam amino kunci pada meropenem yaitu serine 70 dan posisi yang sama pada sisi aktif reseptor dapat ditempati oleh ternatin sehingga berpotensi menyerupai meropenem yang berfungsi sebagai obat kontrol infeksi saluran kemih. Penelitian Nair *et al.* (2015) menyebutkan bahwa ternatin yang merupakan senyawa khas bunga telang biru memiliki potensi sebagai nutrasetikal yang melindungi terhadap penyakit inflamasi kronis seperti infeksi saluran kemih dengan menekan produksi mediator proinflamasi yang berlebihan dari sel makrofag.

**Tabel 4. 7. Tinjauan hasil *in silico* senyawa aktif bunga telang biru**

<b>Ligan</b>	<b>PASS</b>	<b><math>\Delta G</math></b>	<b><i>Solubility</i></b>	<b>PAINS</b>
Cephalotaxine	0,259	-7.9	-2,05	0 <i>alert</i>
<b>Clitorin</b>	<b>0,703</b>	<b>-8.4</b>	<b>-2,86</b>	<b>0 <i>alert</i></b>
Quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside)	0,679	-8.5	-3,10	1 <i>alert</i>
<b>Ternatin</b>	<b>0,508</b>	<b>-7</b>	<b>-4,24</b>	<b>0 <i>alert</i></b>
Meropenem (Kontrol)	0,789	-9.4	-0,33	0 <i>alert</i>

Berdasarkan tabel 4.7 senyawa khas bunga telang biru yaitu clitorin dan ternatin memiliki potensi dalam menghambat *E. coli* ESBL secara *in silico*, ditunjukkan dengan nilai uji PASS > 0,5 yang berarti memiliki kemungkinan aktivitas sebagai senyawa *antibacterial*, nilai  $\Delta G$  mendekati nilai  $\Delta G$  meropenem sebagai kontrol dan menunjukkan bahwa ligan dan reseptor memiliki ikatan yang stabil, nilai solubilitas yang masih dalam rentang  $-6 < \text{Log } S < 0$  yang berarti bahwa senyawa memiliki bioavailabilitas yang baik, senyawa clitorin dan ternatin juga tidak memiliki fragmen atau struktur tidak stabil secara yang berpotensi toksik ditunjukkan dengan parameter PAINS yang memiliki 0 *alert*. Senyawa clitorin dan ternatin memiliki potensi yang lebih baik daripada senyawa cephalotaxine dan quercetin 3-(6''-malonylneoheperidoside) karena pada senyawa cephalotaxine memiliki nilai PASS < 0,5 dan menunjukkan tidak adanya potensi sebagai senyawa *antibacterial* sedangkan pada senyawa quercetin 3-(6''-malonylneoheperidoside) memiliki struktur tidak stabil dan berpotensi toksik ditunjukkan dengan parameter PAINS yang memiliki 1 *alert*.

#### 4.4 Kajian Al Quran Terkait Hasil Penelitian

Senyawa antibakteri yang terkandung dalam kombucha bunga telang biru merupakan bukti kebesaran Allah SWT. Semua hal yang diciptakan oleh Allah SWT. di muka bumi ini memiliki manfaat dan tujuan. Allah berfirman pada Al-Qur'an Surat Asy-Syu'ara [26]: 7 yang berbunyi:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”

Makna dari kata زوج pada ayat diatas menurut Abu Ja'far Muhammad bin Jarir Al-Tabari dalam tafsirnya Al-Tabari yaitu macam-macam pasangan tumbuhan yang diciptakan oleh Allah SWT. setelah bumi mati dan tidak terdapat tumbuhan di dalamnya (Al-Tabari, 2008). Menurut Shihab (2017) dalam tafsir Al-Misbah arti dari kata زوج yaitu pasangan. Pasangan yang dimaksud disini yaitu pasangan tumbuhan. Tumbuhan memiliki pasangan untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Contoh dari pasangan tersebut yaitu putik dan benang sari yang terdapat dalam bunga telang biru yang berfungsi sebagai alat perkembangbiakan generatif. Bunga telang biru memiliki berbagai manfaat seperti antipiretik, antiinflamasi, analgesik, diuretik, hingga antibakteri yang menjadikan bunga telang biru termasuk tumbuhan yang baik. Hal tersebut dijelaskan pada kata setelah زوج yaitu كريم yang secara harfiah berarti baik.

Makna dari kata كريم pada ayat di atas menurut tafsir Al-Tabari yaitu الحسن yang berarti baik atau bagus. Tumbuhan yang bagus pada tafsir Al-Tabari diperumpamakan dengan kurma yang bagus yaitu yang memiliki banyak buah dan sedang berputik serta unta betina dan kambing yang dapat menghasilkan susu berlimpah (Al-Tabari, 2008). Menurut Shihab (2017) dalam tafsir Al-Misbah makna dari kata كريم pada ayat di atas berarti semua yang baik untuk tiap-tiap objek yang disifatinya. Kata baik tersebut dimaksudkan pada tumbuhan baik, subur, dan bermanfaat. Seperti halnya pada bunga telang biru yang memiliki kandungan senyawa antosianin khas yaitu ternatin yang dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri.

Hal tersebut merupakan keterkaitan antara penelitian yang dilakukan dengan *habluminallah* atau *mu'amalah ma'alkhalik*. Atas kuasa Allah SWT, senyawa

aktif yang terdapat dalam bunga telang biru dapat digunakan sebagai bahan antibiotik alami dengan mekanisme kerja yang telah diatur oleh Allah SWT. Penggunaan senyawa aktif bunga telang biru sebagai bahan antibiotik alami merupakan salah satu bentuk *tafakur* alam sehingga manusia senantiasa akan selalu bersyukur atas nikmat yang diberikan oleh Allah SWT dan memanfaatkan nikmat yang diberikan oleh Allah di jalan yang benar. Selain itu, *tafakur* alam dapat menjadi sarana mendekatkan diri kepada Allah, mengakui kebesaran dan kekuasaan Allah, mengakui pribadi sebagai makhluk yang lemah. Oleh karena itu, *tafakur* alam sangat penting dilakukan untuk meningkatkan keimanan dan ketaqwaan kepada Allah SWT. Melalui Al-Qur'an Surat Asy-Syu'ara ayat 7 manusia sebagai makhluk Allah SWT. yang berakal diajak untuk menggunakan potensi pikiran dan akal secara maksimal agar dapat mengambil manfaat dan kebaikan dari segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT. dimuka bumi ini termasuk yang dijelaskan pada Al-Qur'an Surat Asy-Syu'ara ayat 7 yaitu tumbuhan. Allah berfirman pada Al-Qur'an Surat Ali-Imran ayat 191 yang berbunyi:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ  
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk, atau dalam keadaan berbaring, dan memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia” Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka”

Ayat diatas menjelaskan tentang ciri-ciri orang berakal (*ulul albab*). Menurut Ahmad Mustafa Al-Maraghi ciri-ciri dari *ulul albab* yaitu orang yang tidak melalaikan Allah SWT. dalam waktunya, merasa tenang hanya dengan

mengingat Allah SWT. Mereka selalu sadar bahwa Allah SWT. setiap saat mengawasi mereka sehingga tenggelam dan sibuk dalam mengoreksi diri sendiri. Tidak cukup menjamin adanya hidayah hanya dengan berdzikir kepada Allah SWT. namun juga disertai dengan memikirkan semua ciptaan Allah SWT. dan rahasiaNya (Al-Maraghi, 1993).

Menurut tafsir Ibnu Katsir dalam Al-Sheikh (2003) *ulul albab* yaitu akal yang bersih dan sempurna yang daripadanya dapat ditemukan keistimewaan hikmah mengenai sesuatu. Adanya ajakan kepada manusia untuk berpikir menunjukkan sesungguhnya dalam segala penciptaan Allah SWT. terdapat tanda-tanda kekuasaan Allah SWT. bagi *ulul albab* dan tidak ada yang sia-sia atas segala penciptaanNya.

Rasulullah bersabda bahwa Allah menciptakan penyakit beserta obat penawarnya dalam hadis riwayat Turmuzi, Abu Daud, dan Ibnu Majah:

وعن أسامة بن شريك قال: قالت الأعراب يا رسول الله ألا نتداوى؟ قال: نعم  
عباد الله تداووا، فإن الله لم يضع داء إلا وضع له شفاء إلا داء واحدا، قالوا: يا  
رسول الله وما هو؟ قال: الهرم

Artinya: “*Dari Usamah bin Syuraik ia berkata: Orang-orang Arab Badui berkata: wahai Rasulullah, bolehkah kami berobat? Rasul menjawab: ya, wahai hamba Allah berobatlah. Sesungguhnya Allah tidak menciptakan penyakit kecuali menciptakan penawarnya kecuali satu penyakit. Mereka bertanya: penyakit apa itu wahai Rasulullah? Rasul menjawab: menjadi tua*” (HR. Turmuzi No. 2038, HR. Abu Daud No. 3855, HR. Ibnu Majah No. 3436)

Hadis tersebut menjelaskan bahwa umat manusia diperintahkan untuk berobat agar dapat sembuh dari penyakit yang dideritanya. Rasulullah menganjurkan umatnya untuk tidak putus asa dan tidak berpangku tangan terhadap penyakitnya, akan tetapi senantiasa selalu berupaya untuk mengobati

penyakitnya. Keterkaitan penelitian yang dilakukan dengan *habluminannas* atau *mu'amalah ma'annas* yaitu senyawa aktif bunga telang memiliki potensi sebagai bahan obat salah satunya yaitu sebagai pengobatan alternatif infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh *E. coli* ESBL. Bunga telang biru juga memiliki berbagai manfaat ketika diolah menjadi minuman kombucha yang dapat dikonsumsi. Kandungan bunga telang biru semakin beragam jika diolah menjadi minuman kombucha, salah satunya yaitu asam asetat yang bersifat sebagai antibakteri sehingga kombucha dapat digunakan sebagai salah satu alternatif pengganti obat infeksi saluran kemih.

Komponen alam berperan penting terhadap pemenuhan kebutuhan manusia dalam melanjutkan keberlangsungan hidup. Manusia sebagai *khalifah* di muka bumi ini harus selalu menjaga keseimbangan alam dan mencegah pencemaran lingkungan agar tidak berdampak pada defisiensi pemenuhan kebutuhan manusia yang diambil dari lingkungan (alam). Salah satu kebutuhan manusia yang dapat diambil dari alam yaitu obat-obatan.

Keterkaitan *habluminal alam* dengan penelitian yang dilakukan yaitu produksi antibiotik  $\beta$ -laktam yang digunakan sebagai terapi untuk infeksi saluran kemih menghasilkan limbah yang mengandung cincin  *$\beta$ -lactamase* dan perlu dilakukan pemutusan cincin. Proses pemutusan cincin  *$\beta$ -lactamase* tersebut dapat berpotensi menyebabkan pencemaran lingkungan. Oleh karena itu, senyawa aktif dalam bunga telang biru yang memiliki potensi sebagai *antibacterial* dapat digunakan sebagai salah satu alternatif untuk dijadikan bahan agen antibiotik. Penggunaan bahan agen antibiotik dari alam lebih aman untuk digunakan dan tidak membahayakan lingkungan sekitar.



## **BAB V PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Kadar total asam dan antosianin total tertinggi terdapat pada kombucha bunga telang biru dengan konsentrasi gula 50% dengan nilai secara berturut-turut yaitu 1,46475% dan 88,3955 mg/L. Kadar total asam yang tinggi diikuti dengan nilai pH yang rendah sebesar 2,585.
2. Kombucha bunga telang biru memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ESBL ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat terbesar pada konsentrasi 50% yaitu 6,9 mm dan tergolong dalam kategori sedang. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) kombucha bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL terdapat pada konsentrasi 40%. Sementara itu, tidak terdapat nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada kombucha bunga telang biru terhadap *E. coli* ESBL karena masih ditemukan adanya bakteri hidup.
3. Senyawa khas bunga telang biru yaitu clitorin dan ternatin memiliki potensi yang baik dalam menghambat *Escherichia coli* *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase* (ESBL) dengan nilai parameter secara berturut yaitu nilai uji PASS (0,703 dan 0,508),  $\Delta G$  (-8,4 dan -7), dan solubilitas (-2,86 dan -4,24).

### **5.2 Saran**

Saran yang perlu dilakukan penelitian ini yaitu perlu dilakukan uji senyawa fitokimia kuantitatif yang lebih spesifik dan perlu dilakukan uji kromatografi untuk mengetahui senyawa aktif pada bunga telang biru yang paling dominan dalam menghambat bakteri *E. coli* *Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdilah, N. A., Rezaldi, F., Pertiwi, F. D., & Fadillah, F. (2022). Fitokimia dan Skrining Awal Metode Bioteknologi Fermentasi Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) sebagai Bahan Aktif Sabun Cuci Tangan Probiotik. *Jurnal Farmasi dan Kesehatan*, 11(1): 44-61.
- Alberto J, Rodríguez, M., Joffré, E., & Sjöling, Å. (2021). *Bacterial Gastrointestinal Infections*. Belanda: Elsevier.
- Ali, E. A. S. (2016). Pharmacological Importance of *Clitoria ternatea* – A Review. *Journal of Pharmacy*, 6(3): 68-83.
- Al-Kaheel, A. D. (2012). *Rahasia Medis dalam Al-Qur'an dan Hadis Operasi Tanpa Luka*. Jakarta: Amzah.
- Al-Maraghi, A. M. (1993). *Tafsir Al-Maraghi*. Semarang: PT. Karya Toha Putra.
- Al-Sheikh, A. (2003). *Lubaabut Tafsir Min Ibnu Katsir (Tafsir Ibnu Katsir) Juz 4*. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Al-Tabari, A. (2008). *Tafsir Al-Tabari Jilid 19*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- American Public Health Association. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition*. Washington DC: American Water Works Association and Water Environmental Federation.
- Anthika, B., Kusumocahyo, S. P., & Sutanto, H. (2015). Ultrasonic Approach in *Clitoria ternatea* L. (Butterfly Pea) Extraction in Water and Extract Sterilization by Ultrafiltration for Eye Drop Active Ingredient. *Procedia Chemistry*, 16: 237-244.
- As-Sa'di, A. B. (2015). *Tafsir Al-Qur'an Jilid 7*. Jakarta: Darul Haq.
- Astutiningsih, C., Setyani, W., & Hindratna, H. (2014). Uji Daya Antibakteri dan Identifikasi Isolat Senyawa Katekin dari Daun Teh (*Camellia sinensis* L. var. *Assamica*). *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 11(2): 50-57.
- Asy-Syaukani, A.I. M. (2011). *Tafsir Fathul Qadir Terj. Amir Hamzah Fachruddin*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Ayed, L., Ben Abid, S., & Hamdi, M. (2016). Development of A Beverage from Red Grape Juice Fermented With The Kombucha Consortium. *Annals of Microbiology*, 67: 111-121.
- Bahreisy, S., & Bahreisy, S. (1988). *Terjemah Singkat Tafsir Ibnu Katsier Jilid 4*. Surabaya: PT. Bina Ilmuoffset.
- BC Centre for Disease Control. (2015). *Food Safety Assessment of Kombucha Tea Recipe and Food Safety Plan*. Columbia: BCCDC.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Research*, 28(1): 235-242.
- Buchori, D., Sinaga, M. S., Dadang, Andarwulan, N., Iswantini, D., Harjadi, M. M., & Mulyanto, B. (2017). *Peningkatan Produksi, Manfaat, dan Sustainability Biodiversitas Tanaman Indonesia 2*. Bogor: IPB Press.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2016). *M100S Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. West Valley: CLSI.

- Coelho, R. M., Almeida, A. L., Amaral, R. Q., Mota, R. N., & Sousa, P. H. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 2(2): 1-12.
- Cooper, G. A. (2014, May 29). *Natural Resources Conservation Service*. Retrieved from United States Department of Agriculture: <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=Clte3>
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Druglikeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Scientific Reports*, 7(42): 1-13.
- Davis, W. W., & Stout, T. R. (1971). Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *APPL. MICROBIOL.*, 22(4): 659-665.
- De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different Temperatures Elect Distinctive Acetic Acid Bacteria Species and Promotes Organic Acids Production During Kombucha Tea Fermentation. *Food Microbiol*, 17: 11-16.
- Dharmawan, A., & Layanto, N. (2018). Mekanisme Resistensi *Acinetobacter baumannii* terhadap Antibiotik Golongan Karbapenem. *J. Kedokt. Meditek.*, 24(68): 67-72.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y.L., Ai, S.M., Liang, J., Sang, P., & Liu, S.Q. (2016). Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(144): 1-34.
- Fardiaz, S. (1992). *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia Pustaka.
- Fikriyah, N., Isnaeni, I., & Darmawati, A. (2021). Antioxidant and Inhibitory Activity of Roselle Extract (*Hibiscus sabdariffa* L.) Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 8(1): 28-33.
- Filimonov, D. A., Lagunin, T. A., Gloriozova, A. V., Rudik, D. S., Druzhilovskii, P. V., & Poroikov. (2014). Prediction of The Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the PASS Online Web Resources. *Russian Original*, 50(3): 444-457.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, J. S. (2015). Urinary Tract Infections: Epidemiology, Mechanisms of Infection and Treatment Options. *Microbiology*, 13: 269-284.
- Forbes, B., Weissfeld, A., & Sahm, D. (2007). *Laboratory Methods and Strategies for Antimicrobial Susceptibility Testing In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: Elsevier.
- Grabe, M., Bartoletti, R., Johansen, T. B., Cai, T., Cek, M., Koves, B., & Wullt, B. (2015). *Guidelines on Urological Infections*. Belanda: European Association of Urology.
- Haghighatpanah, M., Nejad, A. S., Mojtahedi, A., Amirmozafari, N., & Zeighami, H. (2016). Detection of Extended-Spectrum B-Lactamase (ESBL) and Plasmid-Borne blaCTX-M and blaTEM Genes Among Clinical Strains of *Escherichia coli* Isolated from Patients in The North of Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 7: 110-113.
- Heller, A. A., & Spence, D. M. (2019). A Rapid Method for Post-Antibiotic Bacterial Susceptibility Testing. *Plos One*, 14(1): 1-13.
- IAUI. (2020). *Tata Laksana Infeksi Saluran Kemih dan Genitalia Pria*. Surabaya: Ikatan Ahli Urologi Indonesia.

- Ivanov, S. M., Lagunin, A. A., Rudik, A. V., Filimonov, D. A., & Poroikov, V. V. (2018). ADVERPred–Web Service for Prediction of Adverse Effects of Drugs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58: 8-11.
- Jawetz, E. L., Melnick, & Edward, A. (2012). *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Júnior, R. J., & Batista, R. A. (2009). Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kombucha Colonies. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 1(1): 72-78.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2: 123-140.
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., & Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound Databases. *Nucleic Acids Research*, 44: 202-213.
- Kosasi, C., Lolo, W., & Sedewi, S. (2019). Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Bakteri yang Berasosiasi dengan Alga *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh serta Identifikasi Secara Biokimia. *Pharmakon*, 8(2): 351-359.
- Kumar, V., & Joshi, V. K. (2016). Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. *Intl. J. Food. Ferment. Technol.*, 6(1): 13-24.
- Kurniawan, M., Ginting, S., & Nurminah, M. (2017). Pengaruh Penambahan Gula dan Starter Terhadap Karakteristik Minuman Teh Kombucha Daun Gambir (*Uncaria gambir* Roxb). *J.Rekayasa Pangan dan Pert.*, 5(2): 251-257.
- Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current Challenges, Applications and Future Perspectives of SCOBY Cellulose of Kombucha Fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 295: 1-20.
- Lacombe, A., Wu, V. C., Tyler, S., & Edwards, K. (2010). Antimicrobial Action of the American Cranberry Constituents; Phenolics, Anthocyanins, and Organic Acids, Against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 102-107.
- Lagunin, A., Stepanchikova, A., Filimonov, D., & Poroikov, V. (2000). PASS: Prediction of Activity Spectra for Biologically Active Substances. *Bioinformatics Applications Note*, 16(8): 747-748.
- Lakhera, S., Devlal, K., Rana, M., & Celik, I. (2022). Study of Nonlinear Optical Responses of Phytochemicals of *Clitoria ternatea* by Quantum Mechanical Approach and Investigation of Their Anti-Alzheimer Activity with In Silico Approach. *Structural Chemistry*, 1-16.
- Lee, J. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 88(5): 1269-1278.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2012). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 4-17.
- Mailoa, M. N., Tapotubun, A. M., & Matrutty, T. (2017). Analisis Total Plate Counte (TPC) on Fresh Steak Tuna Applications Edible Coating *Caulerpa*

- sp During Stored at Chilling Temperature. *Earth and Environmental Science*, 89: 1-6.
- Manivannan, R. (2019). Isolation and Characterizations of New Alkaloid 3-deoxy- 3, 11-epoxy Cephalotaxine from *Clitoria ternatea*. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 9(4-A): 458-462.
- Mantziari, A., Salminen, S., Szajewska, H., & Malagón-Rojas, J. N. (2020). Postbiotics Against Pathogens Commonly Involved in Pediatric Infectious Diseases. *Microorganisms*, 8(1510): 1-22.
- Marliana, S. D., Suryanti, V., & Suyono. (2005). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*, 3(1): 26-31.
- Medwick, T., & Kirschner, E. (2010). Evaluation of Automatic Potentiometric Titrator in Nonaqueous Titrations. *J Pharm Sci*, 55(11): 1296-1300.
- Meigaria, K. M., Mudianta, I. W., & Martiningsih, N. W. (2016). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Aseton Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Jurnal Wahana Matematika Dan Sains*, 10(2): 1-11.
- Mahanthesh, MT., Ranjith, D., Yaligar, R., Jyothi, R., Narappa, G., & Ravi, MV. (2020). Swiss ADME Prediction of Phytochemicals Present in *Butea monosperma* (Lam.) Taub. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(3): 1799-1809.
- Munfaati, P. N., Ratnasari, E., & Trimulyono, G. (2015). Aktivitas Senyawa Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* Secara in Vitro. *Lentera Bio*, 4(1): 64-71.
- Naidu, A. S. (2000). *Natural Food Antimicrobial Systems*. New York: CRC Press.
- Nair, V., Bang, W.Y., Schreckinger, E., Andarwulan, N., & Cisneros-Zevallos, L. (2015). Protective Role of Ternatin Anthocyanins and Quercetin Glycosides from Butterfly Pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) Blue Flower Petals against Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammation in Macrophage Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 6355-6365.
- Nascimento, H. H., Silva, L. E., Souza, R. T., Silva, N. P., & Scaletsky, I. C. (2014). Phenotypic and Genotypic Characteristics Associated With Biofilm Formation in Clinical Isolates of Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) Strains. *BMC Microbiology*, 14: 184-190.
- Nugrahani, R., Andayani, Y., & Hakim, A. (2016). Skrining Fitokimia dari Ekstrak Buah Bumcis (*Phaseolus vulgaris*) dalam Sediaan Serbuk. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 2(1): 96-103.
- Nnummer, B. A. (2013). Kombucha Brewing Under The Food and Drug Administration Model Food Code: Risk Analysis and Processing Guidance Abstract. *Journal of Environmental Health*, 76(4): 8-12.
- Oguis, G. K., Gilding, E. K., Jackson, M. A., & Craik, D. J. (2019). Butterfly Pea (*Clitoria ternatea*), A Cyclotide-Bearing Plant With Applications in Agriculture and Medicine. *Frontiers in Plant Science*, 10(645): 1-23.
- Owuama, C. I. (2017). Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) using a Novel Dilution Tube Method. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 11(23): 977-980.

- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(12): 4943–4960.
- Pardede, S. O., Tambunan, T., Husein, A., Trihono, P. P., & Hidayati, E. L. (2011). *Konsensus Infeksi Saluran Kemih pada Anak*. Jakarta: Badan Penerbit Ikatan Dokter Anak Indonesia.
- Pardede, S. O. (2018). Infeksi pada Ginjal dan Saluran Kemih Anak: Manifestasi Klinis dan Tata Laksana. *Sari Pediatri*, 19(6): 364-374.
- Pawar, S., & Rohane, S. (2021). Review on Discovery Studio: An Important Tool for Molecular Docking. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 14(1): 86-88.
- Pelczar, M. J., & E C S, C. (1998). *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2*. Jakarta: UI Press.
- Pemberton, O. A., Noor, R. E., Kumar, V., Sanishvili, R., Kemp, M. T., Kearns, F. L., & Chen, Y. (2020). Mechanism of Proton Transfer in Class A  $\beta$ -lactamase Catalysis and Inhibition by Avibactam. *PNAS*, 117(11): 5818–5825.
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2008). Genetic Support of Extended Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Infect*, 14(1): 75-81.
- Purnomo, & Basuki, B. (2014). *Dasar-Dasar Urologi Edisi Ketiga*. Malang: CV Sagung Seto.
- Rahmawati, S., Ahwan, & Qonitah, F. (2021). Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Metanol Daun Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Terhadap *Escherichia coli* ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase). *Repository Usahid*, 3-13.
- Rezaldi, F., Ningtias, R. Y., Anggraeni, S. D., Ma'ruf, A., Fatonah, N. S., Pertiwi, F. D., & Subekhi, A. I. (2021). Pengaruh Metode Bioteknologi Fermentasi Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) sebagai Antibakteri Gram Positif dan Negatif. *Jurnal Biotek*, 9(2): 169-185.
- Rezaldi, F., Pertiwi, F. D., Yunita, Rustini, & Hidayanto, F. (2022). Potensi Buah Nanas Madu Subang (*Ananas comasus*) sebagai Antibakteri Gram Positif Negatif Melalui Metode Bioteknologi Fermentasi Kombucha Berdasarkan Konsentrasi Gula Aren Berbeda. *Jurnal Biofarmasetikal Tropis*, 5(2): 119-126.
- Rezaldi, F., Rachmat, O., Fadillah, F., Setyaji, D. Y., & Saddam, A. (2022). Bioteknologi Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) Sebagai Antibakteri *Salmonella thypi* dan *Vibrio parahaemolyticus* Berdasarkan Konsentrasi Gula Aren. *Jurnal Gizi Kerja dan Produktivitas*, 3(1): 13-22.
- Rizal, S., Suharyono, & Amelia, J. R. (2019). Pengaruh Penambahan Larutan Sukrosa Terhadap Aktivitas Antibakteri Minuman Sinbiotik Ekstrak Cincau Hijau Selama Penyimpanan Pada Suhu Dingin. *Jurnal Ilmu Pertanian*, 31(1): 53-66.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi Edisi Ke 6*. North Amherst: Cordus Press.
- Rohman, A., Dwiloka, B., & Rizqiati, H. (2019). Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Total Asam, Total Bakteri Asam Laktat, Total Khamir dan Mutu Hedonik Kefir Air Kelapa Hijau (*Cocos nucifera*). *Jurnal Teknologi Pangan*, 3(1): 127-133.

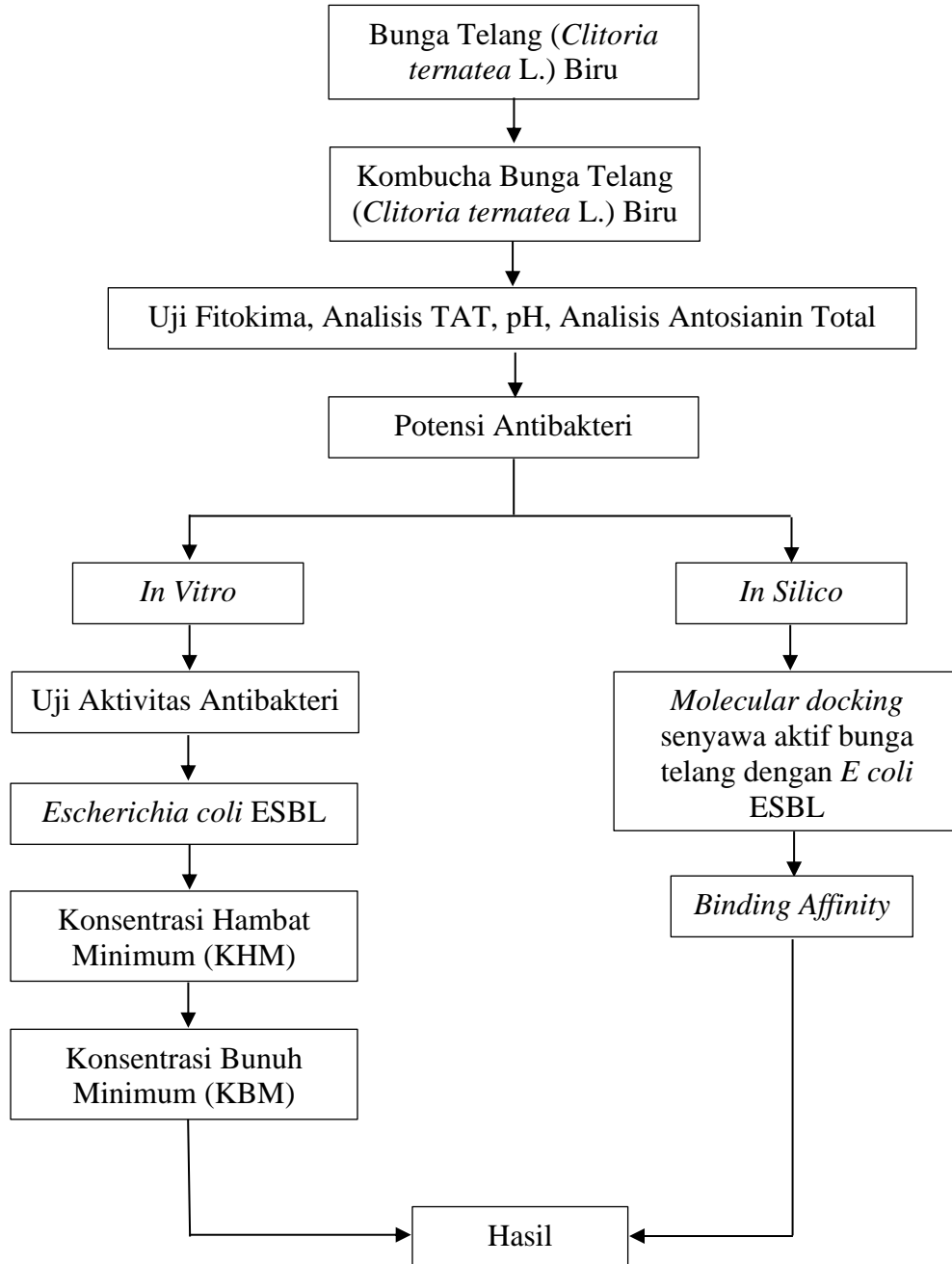
- Sangi, M., Runtuwene, M. R., Simbala, H., & Makang, V. (2008). Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chem. Prog.*, 1(1): 47-53.
- Saponjac, V. T., & Vulic, J. J. (2014). Antioxidant and Antibacterial Activity of The Beverage Obtained by Fermentation of Sweetened Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Tea With Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 52(4): 420-429.
- Shihab, M. (2002). *Tafsir Al-Mishbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M. (2009). *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Quran Volume 11*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shihab, M. (2017). *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al Qur'an*. Tangerang: Lentera Hati.
- Singh, N. K., Garabadu, D., Sharma, P., Shrivastava, S. K., & Mishra, P. (2018). Anti-Allergy and Anti-Tussive Activity of *Clitoria ternatea* L. in Experimental Animals. *Journal Ethnopharmacol*, 224: 15-26.
- Soeroso, E. G., Lestario, L. N., & Martono, Y. (2017). Penambahan Gula dapat Meningkatkan Stabilitas Warna Ekstrak Antosianin Buah Murbei Hitam yang Terpapar Cahaya Floresens. *J. Teknol. dan Industri Pangan*, 28(1): 62-69.
- Sun, X. H., Zhou, T. T., Wei, C. H., Lan, W. Q., Zhao, Y., Pan, Y. J., & Wu, V. C. (2018). Antibacterial Effect and Mechanism of Anthocyanin Rich Chinese Wild Blueberry Extract on Various Foodborne Pathogens. *Food Control*, 62(25): 1-24.
- Suwarto, S. (2014). *Implementing The Clinical Science in Tropical Medicine Daily Practice*. Jakarta: Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam.
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019).  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431: 3472–3500.
- Trott, O., & Olson, A. (2010). AutoDock Vina: Improving The Speed and Accuracy of Docking with A New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. *J Comput Chem*, 31(2): 455-461.
- Turnos, L. J. (2021). Blue Ternate (*Clitoria Ternatea* L.): Nutritive Analysis of Flowers and Seeds . *Asian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 2(2): 103-112.
- Uganda National Bureau of Standards. (2018). *Kombucha Specification, First Edition*. Uganda: UNBS.
- Uma, B., Prabhakar, K., & Rajendran, S. (2009). Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Clitoria ternatea* Linn Against Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Enteric and Urinary Pathogens. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2(4): 94-96.
- Unawahi, S., Widyasanti, A., & Rahimah, S. (2022). Ekstraksi Antosianin Bunga Telang (*Clitoria ternatea* Linn) dengan Metode Ultrasonik Menggunakan Pelarut Aquades dan Asam Asetat. *Jurnal Keteknikaan Pertanian Tropis dan Biosistem*, 10(1): 1-9.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.P., & Taillandier, P. (2018). Under-Standing Kombucha Tea Fermentation: a Review. *J Food Sci*, 83(3): 8-58.

- Vuong, T. T., Srivichai, S., & Hongsprabhas, P. (2021). Effect of Sugar and CaCl<sub>2</sub> Concentration on Fluorescence Quenching Characteristics of Whey Proteins by Delphinidin Derivatives from Butterfly Pea flower. *Agr. Nat. Resour*, 55: 569-578.
- Wang, J., Krudy, G., Hou, T., Zhang, W., Holland, G., & Xu, X. (2007). Development of Reliable Aqueous Solubility Models and Their Application in Druglike Analysis. *J. Chem. Inf. Model.*, 47: 1395-1404.
- Wistiana, D., & Zubaidah, E. (2015). Karakteristik Kimiawi dan Mikrobiologis Kombucha dari Berbagai Daun Tinggi Fenol Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(4): 1446-1457.
- Wiyantoko, B., & Astuti. (2020). Butterfly Pea (*Clitoria Ternatea* L.) Extract as Indicator of Acid-Base Titration. *Indonesian Journal of Chemical Analysis*, 3(1): 22-32.
- Wongthai, N., Tanticharakunsiri, W., Mangmool, S., & Ochaikul, D. (2021). Characteristics and Antioxidant Activity of Royal Lotus Pollen, Butterfly Pea Flower, and Oolong Tea Kombucha Beverages. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 26(04): 1-11.
- Yadav, K., & Prakash, S. (2017). Screening of ESBL Producing Multidrug Resistant *E. coli* from Urinary Tract Infection Suspected Cases in Southern Terai of Nepal. *Journal of Infectious Diseases and Diagnosis*, 2(2): 1-8.
- Yuan, S., Chan, H., & Hu, Z. (2017). Using PyMOL as A Platform for Computational Drug Design. *Wires Computational Molecular Science*, 12(98): 1-10.
- Yuningtyas, S., Masaenah, E., & Telaumbanua, M. (2021). Aktivitas Antioksidan, Total Fenol, dan Kadar Vitamin C dari Kombucha Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.). *Jurnal Farmamedika*, 6(1): 10-14.
- Yusmaniar, Wardiyah, & Nida, K. (2017). *Mikrobiologi dan Parasitologi*. Jakarta: Badan Pengembangan dan Pemberdayaan Sumber Daya Manusia Kesehatan.
- Zeng, Z., Zhan, J., Zhang, K., Chen, H., & Cheng, S. (2022). Global, Regional, and National Burden of Urinary Tract Infections from 1990-2019: an Analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Journal of Urology*, 1-19.
- Zhang, D., Cheng, Z., & Huang, X. (2021). A Review of Phytochemistry and Pharmacology Perspectives of *Clitoria ternatea* L. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 16(3): 153-160.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Rancangan Penelitian



## Lampiran 2. Rumus Perhitungan

### 2.1 Perhitungan Kultur SCOBY Kombucha

Kandungan bunga telang biru dalam kombucha digunakan 2% pervolume yang akan dibuat:

$$\frac{2}{100} = \frac{X}{1000 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{2 \times 1000}{100}$$

$$X = \frac{2000}{100}$$

$$X = 20 \text{ gr}$$

Jadi untuk membuat 1000 mL kombucha bunga telang biru yang digunakan sebagai media kultur SCOBY kombucha digunakan 20 gr bunga telang biru kering.

Kandungan gula dalam kombucha digunakan 10% pervolume yang akan dibuat:

$$\frac{10}{100} = \frac{X}{1000 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{10 \times 1000}{100}$$

$$X = \frac{10000}{100}$$

$$X = 100 \text{ gr}$$

Jadi untuk membuat 1000 mL kombucha bunga telang biru yang digunakan sebagai media kultur SCOBY kombucha digunakan 100 gr gula.

Kandungan starter kombucha cair (v/v) dan scooby (b/v) dalam kombucha digunakan 10% pervolume yang akan dibuat:

$$\frac{10}{100} = \frac{X}{1000 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{10 \times 1000}{100}$$

$$X = \frac{10000}{100}$$

$$X = 100 \text{ mL}$$

$$\frac{10}{100} = \frac{X}{1000 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{10 \times 1000}{100}$$

$$X = \frac{10000}{100}$$

$$X = 100 \text{ gr}$$

Jadi untuk membuat 1000 mL kombucha bunga telang biru yang digunakan sebagai media kultur SCOBY kombucha digunakan 100 mL starter kombucha cair dan 100 gr SCOBY.

## 2.2 Perhitungan Konsentrasi Gula

Perhitungan konsentrasi gula 20%, 30%, 40%, 50% sebagai berikut:

- a. Konsentrasi 20%

$$\frac{20}{100} = \frac{X}{600 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{20 \times 600}{100}$$

$$X = \frac{12000}{100}$$

$$X = 120 \text{ gr}$$

Jadi gula yang digunakan dalam kombucha 600 mL dengan konsentrasi gula 20% sebesar 120 gr.

- b. Konsentrasi 30%

$$\frac{30}{100} = \frac{X}{600 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{30 \times 600}{100}$$

$$X = \frac{18000}{100}$$

$$X = 180 \text{ gr}$$

Jadi gula yang digunakan dalam kombucha 600 mL dengan konsentrasi gula 30% sebesar 180 gr.

- c. Konsentrasi 40%

$$\frac{40}{100} = \frac{X}{600 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{40 \times 600}{100}$$

$$X = \frac{24000}{100}$$

$$X = 240 \text{ gr}$$

Jadi gula yang digunakan dalam kombucha 600 mL dengan konsentrasi gula 40% sebesar 240 gr.

d. Konsentrasi 50%

$$\frac{50}{100} = \frac{X}{600 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{50 \times 600}{100}$$

$$X = \frac{30000}{100}$$

$$X = 300 \text{ gr}$$

Jadi gula yang digunakan dalam kombucha 600 mL dengan konsentrasi gula 50% sebesar 300 gr.

### 2.3 Perhitungan Starter Kombucha Telang Biru Cair, SCOBY, dan Bunga Telang Biru

Kandungan bunga telang biru dalam kombucha digunakan 2% pervolume yang akan dibuat yaitu 600 ml pada setiap perlakuan konsentrasi gula:

$$\frac{2}{100} = \frac{X}{600 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{2 \times 600}{100}$$

$$X = \frac{1200}{100}$$

$$X = 12 \text{ gr}$$

Jadi untuk membuat 600 mL kombucha bunga telang biru pada berbagai perlakuan konsentrasi digunakan 12 gr bunga telang biru kering.

Kandungan starter kombucha telang cair (v/v) dan scoby (b/v) dalam kombucha dengan berbagai perlakuan konsentrasi gula digunakan 10% pervolume yang akan dibuat yaitu 600 ml:

$$\frac{10}{100} = \frac{X}{600 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{10 \times 600}{100}$$

$$X = \frac{6000}{100}$$

$$X = 60 \text{ mL}$$

$$\frac{10}{100} = \frac{X}{600 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{10 \times 600}{100}$$

$$X = \frac{6000}{100}$$

$$X = 60 \text{ gr}$$

Jadi untuk membuat 1000 mL kombucha bunga telang biru yang digunakan sebagai media kultur SCOBY kombucha digunakan 60 mL starter kombucha telang cair dan 60 gr SCOBY.

## 2.4 Perhitungan Media NA, NB, dan TSIA

Stock awal media NA dengan perhitungan 28 gr / 1000 mL, untuk membuat 100 mL media NA menggunakan perhitungan berikut:

$$\frac{28 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}} = \frac{X}{100 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{28 \times 100}{1000}$$

$$X = \frac{2800}{1000}$$

$$X = 2,8 \text{ gr}$$

Jadi untuk membuat 100 mL media NA dibutuhkan 2,8 gr serbuk media NA dan 100 mL aquades.

Stock awal media NB dengan perhitungan 13 gr / 1000 mL, untuk membuat 100 mL media NB menggunakan perhitungan berikut:

$$\frac{13 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}} = \frac{X}{100 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{13 \times 100}{1000}$$

$$X = \frac{1300}{1000}$$

$$X = 1,3 \text{ gr}$$

Jadi untuk membuat 100 mL media NB dibutuhkan 1,3 gr serbuk media NB dan 100 mL aquades.

Stock awal media TSIA dengan perhitungan 64,52 gr / 1000 mL, untuk membuat 50 mL media TSIA menggunakan perhitungan berikut:

$$\frac{64,52 \text{ gr}}{1000 \text{ mL}} = \frac{X}{50 \text{ mL}}$$

$$X = \frac{64,52 \times 50}{1000}$$

$$X = \frac{3226}{1000}$$

$$X = 3,2 \text{ gr}$$

Jadi untuk membuat 50 mL media TSIA dibutuhkan 3,2 gr serbuk media TSIA dan 100 mL aquades.

## 2.5 Perhitungan Kadar Total Asam

Perhitungan normalitas NaOH

V (COOH)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O : jumlah asam oksalat (0,1 gr)  
 Mr (COOH)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O : massa molekul relatif asam oksalat (126)  
 V NaOH : volume NaOH (0,01515 L)

$$\begin{aligned} \text{Normalitas NaOH} &= \frac{V (\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \times 2}{\text{Mr} ((\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) \times V \text{ NaOH}} \\ &= \frac{0,1 \times 2}{126 \times 0,01515} \\ &= \frac{0,2}{1,9} \\ &= 0,105 \text{ N} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Total Asam (\%)} &= \frac{V \text{ titran} \times N \text{ titran} \times \text{FP} \times \text{BM CH}_3\text{COOH}}{V \text{ sampel} \times 1000} \times 100\% \\ &= \frac{3 \times 0,105 \times 5 \times 60}{10 \times 1000} \times 100\% \\ &= \frac{3 \times 0,105 \times 5 \times 60}{10000} \times 100\% \\ &= \frac{94,5}{10000} \times 100\% \\ &= 0,00945 \times 100\% \\ &= 0,945 \% \end{aligned}$$

Keterangan:

V titran : jumlah larutan NaOH untuk titrasi (3 ml)  
 N titran : normalitas NaOH (0,105 N)  
 FP : faktor pengenceran (250/50 = 5)  
 BM : berat molekul asam asetat (60)  
 V sampel : volume sampel kombucha (10 ml)

## 2.6 Perhitungan Kadar Antosianin Total

$$\begin{aligned} A &= (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}_1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}_{4,5}} \\ &= (0,568 - 0,056) - (0,477 - 0,053) \\ &= 0,512 - 0,424 \\ &= 0,088 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Antosianin Total (mg/L)} &= \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times I} \\
 &= \frac{0,088 \times 1638 \times 10 \times 1000}{29000 \times 1} \\
 &= \frac{1441440}{29000 \times 1} \\
 &= 49,70483 \text{ mg/L}
 \end{aligned}$$

Keterangan:

A : nilai absorbansi sampel

MW : berat molekul ternatin (1638 g/mol)

DF : faktor pengenceran (v total/v sampel = 10/1 = 10)

$\epsilon$  : absorbtivitas molar ternatin (29000 L x cm<sup>-1</sup> x mol<sup>-1</sup>)

I : lebar kuvet (1 cm)

### 2.7 Perhitungan Zona Hambat

$$\begin{aligned}
 \text{Zona Hambat (mm)} &= \frac{d1 + d2}{2} - x \\
 &= \frac{8 + 9}{2} - 6 \\
 &= \frac{17}{2} - 6 \\
 &= 2,5
 \end{aligned}$$

### 2.8 Perhitungan *Total Plate Count* (TPC)

$$\begin{aligned}
 \Sigma \text{ bakteri hidup (CFU/mL)} &= \frac{\Sigma \text{ Koloni}}{\text{Volume Inokulum} \times \text{Faktor Pengenceran}} \\
 &= \frac{175}{0,2 \times \frac{1}{10}} \\
 &= \frac{175}{0,02} \\
 &= 8750 \\
 &= 8,75 \times 10^3 \text{ CFU/mL}
 \end{aligned}$$

**Lampiran 3. Data Hasil Analisis Total Asam**

<b>Perlakuan</b>	<b>Ulangan</b>	<b>V NaOH</b>	<b>% TAT</b>	<b>Rata-Rata</b>
20%	1	3	0.945	1.02375
	2	3.4	1.071	
	3	3.3	1.0395	
	4	3.3	1.0395	
30%	1	4	1.26	1.08675
	2	3.5	1.1025	
	3	3.3	1.0395	
	4	3	0.945	
40%	1	3	0.945	1.110375
	2	3.6	1.134	
	3	4	1.26	
	4	3.5	1.1025	
50%	1	5	1.575	1.46475
	2	4.5	1.4175	
	3	4.6	1.449	
	4	4.5	1.4175	

**Lampiran 4. Data Hasil Analisis Nilai pH**

<b>Perlakuan</b>	<b>Ulangan</b>	<b>pH</b>	<b>Rata-Rata</b>
20%	1	3.3	3.525
	2	3.5	
	3	3.7	
	4	3.6	
30%	1	3.2	3.1375
	2	3	
	3	3.1	
	4	3.25	
40%	1	2.86	2.8375
	2	2.78	
	3	2.81	
	4	2.9	
50%	1	2.64	2.585
	2	2.5	
	3	2.61	
	4	2.59	



**Lampiran 5. Data Hasil Analisis Kadar Antosianin Total**

Perlakuan	Ulangan	Absorbansi pH 1		Absorbansi pH 4,5		Antosianin Total
		520 nm	700 nm	520 nm	700 nm	
20%	1	0.568	0.056	0.477	0.053	49.70483
	2	0.596	0.053	0.477	0.017	46.88069
	3	0.583	0.038	0.537	0.053	34.45448
	4	0.577	0.061	0.464	0.034	48.57517
30%	1	0.632	0.056	0.509	0.032	55.91793
	2	0.631	0.045	0.508	0.019	54.78828
	3	0.624	0.038	0.501	0.021	59.87172
	4	0.633	0.055	0.511	0.022	50.26966
40%	1	0.762	0.082	0.647	0.092	70.60345
	2	0.716	0.049	0.628	0.095	75.6869
	3	0.721	0.059	0.639	0.096	67.21448
	4	0.764	0.066	0.672	0.084	62.13103
50%	1	0.72	0.111	0.633	0.172	83.59448
	2	0.778	0.107	0.644	0.121	83.59448
	3	0.789	0.106	0.65	0.129	91.50207
	4	0.758	0.103	0.619	0.132	94.89103

**Lampiran 6. Data Diameter Zona Hambat**

Perlakuan	Ulangan				Rata-Rata
	1	2	3	4	
20%	2,5	0,5	0,5	4,5	2
30%	2	1,5	3	2	2,125
40%	5,5	4	5,5	7	5,5
50%	6,5	5,5	7	8,5	6,875
K+	23,5	26	23,5	27	25
K-	0	0	0	0	0

Keterangan: K+ (Meropenem), K- (Aquadres)

**Lampiran 7. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum**

Prlk	Nilai <i>Optical Density</i> (OD)									
	1		2		3		4		Rata-Rata	
	Bef I	Aft I	Bef I	Aft I	Bef I	Aft I	Bef I	Aft I	Bef I	Aft I
20%	0.315	0.313	0.308	0.31	0.228	0.295	0.332	0.33	0,295	0,312
30%	0.263	0.275	0.234	0.261	0.19	0.258	0.189	0.237	0,219	0,257
40%	0.281	0.257	0.242	0.238	0.215	0.206	0.267	0.249	0,251	0,237
50%	0.381	0.364	0.313	0.284	0.31	0.289	0.367	0.34	0,342	0,319
K+	0.121	0.003	0.117	0.002	0.098	0.006	0.101	0.003	0,109	0,003
K-	0.197	0.478	0.145	0.489	0.195	0.476	0.165	0.435	0,175	0,469

Keterangan: Bef I (Sebelum Inkubasi), Aft I (Sesudah Inkubasi), K+ (Meropenem), K- (Aquadres)

### Lampiran 8. Data Jumlah Koloni Bakteri *E. coli* ESBL

Perlakuan	Ulangan				Rata-Rata
	1	2	3	4	
40%	182	165	170	183	175
50%	89	96	85	62	83
K+	0	0	0	0	0

### Lampiran 9. Hasil Uji Normalitas

#### 9.1 Uji Normalitas Data Total Asam, pH, dan Antosianin Total

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Antosianin	.122	16	.200 <sup>*</sup>	.958	16	.620
TAT	.199	16	.090	.894	16	.064
pH	.127	16	.200 <sup>*</sup>	.949	16	.474

\*. This is a lower bound of the true significance.  
a. Lilliefors Significance Correction

#### 9.2 Uji Normalitas Data Zona Hambat

Tests of Normality							
	Konsentrasi Gula	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Zona Hambat	20%	.283	4	.	.863	4	.272
	30%	.329	4	.	.895	4	.406
	40%	.250	4	.	.945	4	.683
	50%	.210	4	.	.982	4	.911
	K+	.300	4	.	.838	4	.189
	K-	.	4	.	.	4	.

a. Lilliefors Significance Correction

## Lampiran 10. Hasil Uji Homogenitas

### 10.1 Uji Homogenitas Data Total Asam

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
TAT	Based on Mean	.728	3	12	.555
	Based on Median	.789	3	12	.523
	Based on Median and with adjusted df	.789	3	10.338	.527
	Based on trimmed mean	.746	3	12	.545

### 10.2 Uji Homogenitas Data pH

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
pH	Based on Mean	2.109	3	12	.153
	Based on Median	1.922	3	12	.180
	Based on Median and with adjusted df	1.922	3	6.059	.226
	Based on trimmed mean	2.113	3	12	.152

### 10.3 Uji Homogenitas Data Antosianin Total

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Antosianin Total	Based on Mean	.659	3	12	.593
	Based on Median	.245	3	12	.863
	Based on Median and with adjusted df	.245	3	6.026	.862
	Based on trimmed mean	.564	3	12	.649

## 10.4 Uji Homogenitas Data Zona Hambat

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zona Hambat	Based on Mean	3.703	5	18	.018
	Based on Median	3.099	5	18	.034
	Based on Median and with adjusted df	3.099	5	11.726	.052
	Based on trimmed mean	3.693	5	18	.018

## Lampiran 11. Hasil Uji ANOVA

### 11.1 Hasil Uji ANOVA Data Total Asam

ANOVA					
TAT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.475	3	.158	14.757	.000
Within Groups	.129	12	.011		
Total	.604	15			

### 11.2 Hasil Uji ANOVA Data pH

ANOVA					
pH	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.965	3	.655	54.690	.000
Within Groups	.144	12	.012		
Total	2.109	15			

### 11.3 Hasil Uji ANOVA Data Antosianin Total

ANOVA					
Antosianin Total					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4242.523	3	1414.174	43.290	.000
Within Groups	392.008	12	32.667		
Total	4634.532	15			

### Lampiran 12. Hasil Uji BNT

#### 12.1 Hasil Uji BNT Data Total Asam

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: TAT						
LSD						
(I) Konsentrasi Gula	(J) Konsentrasi Gula	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
20%	30%	-.0630000	.0732417	.407	-.222580	.096580
	40%	-.0866250	.0732417	.260	-.246205	.072955
	50%	-.4410000*	.0732417	.000	-.600580	-.281420
30%	20%	.0630000	.0732417	.407	-.096580	.222580
	40%	-.0236250	.0732417	.753	-.183205	.135955
	50%	-.3780000*	.0732417	.000	-.537580	-.218420
40%	20%	.0866250	.0732417	.260	-.072955	.246205
	30%	.0236250	.0732417	.753	-.135955	.183205
	50%	-.3543750*	.0732417	.000	-.513955	-.194795
50%	20%	.4410000*	.0732417	.000	.281420	.600580
	30%	.3780000*	.0732417	.000	.218420	.537580
	40%	.3543750*	.0732417	.000	.194795	.513955

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## 12.2 Hasil Uji BNT Data pH

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: pH						
LSD						
(I) Konsentrasi Gula	(J) Konsentrasi Gula	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
20%	30%	.38750*	.07739	.000	.2189	.5561
	40%	.68750*	.07739	.000	.5189	.8561
	50%	.94000*	.07739	.000	.7714	1.1086
30%	20%	-.38750*	.07739	.000	-.5561	-.2189
	40%	.30000*	.07739	.002	.1314	.4686
	50%	.55250*	.07739	.000	.3839	.7211
40%	20%	-.68750*	.07739	.000	-.8561	-.5189
	30%	-.30000*	.07739	.002	-.4686	-.1314
	50%	.25250*	.07739	.007	.0839	.4211
50%	20%	-.94000*	.07739	.000	-1.1086	-.7714
	30%	-.55250*	.07739	.000	-.7211	-.3839
	40%	-.25250*	.07739	.007	-.4211	-.0839

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## 12.3 Hasil Uji BNT Data Antosianin Total

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Antosianin Total						
LSD						
(I) Konsentrasi Gula	(J) Konsentrasi Gula	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
20%	30%	-10.3081034*	4.04149498	.025	-19.1137646	-1.5024423
	40%	-24.0051724*	4.04149498	.000	-32.8108335	-15.1995113
	50%	-43.4917241*	4.04149498	.000	-52.2973853	-34.6860630
30%	20%	10.30810345*	4.04149498	.025	1.5024423	19.1137646
	40%	-13.6970690*	4.04149498	.005	-22.5027301	-4.8914078
	50%	-33.1836207*	4.04149498	.000	-41.9892818	-24.3779596
40%	20%	24.00517241*	4.04149498	.000	15.1995113	32.8108335
	30%	13.69706897*	4.04149498	.005	4.8914078	22.5027301
	50%	-19.4865517*	4.04149498	.000	-28.2922128	-10.6808906
50%	20%	43.49172414*	4.04149498	.000	34.6860630	52.2973853
	30%	33.18362069*	4.04149498	.000	24.3779596	41.9892818
	40%	19.48655173*	4.04149498	.000	10.6808906	28.2922128




\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.




### Lampiran 13. Hasil Uji Kruskal Wallis Data Zona Hambat

Test Statistics <sup>a,b</sup>	
Zona Hambat	
Kruskal-Wallis H	21.224
df	5
Asymp. Sig.	.001

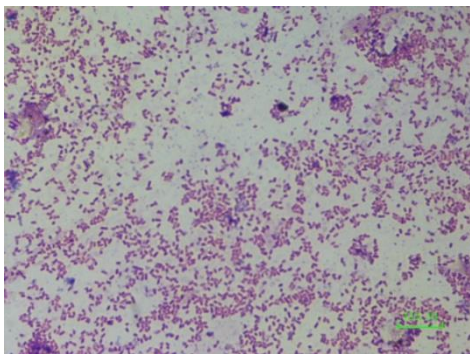
a. Kruskal Wallis Test  
b. Grouping Variable:  
Konsentrasi Gula

### Lampiran 14. Hasil Uji Fitokimia

Kandungan Fitokimia	Gambar
Alkaloid	 <p>Pereaksi Dragendorff</p>
	 <p>Pereaksi Wagner</p>
	 <p>Pereaksi Mayer</p>

Flavonoid	
Saponin	
Tanin	

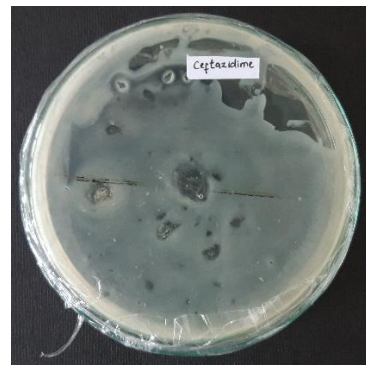
### Lampiran 15. Hasil Konfirmasi *E. coli* ESBL



Pewarnaan Gram



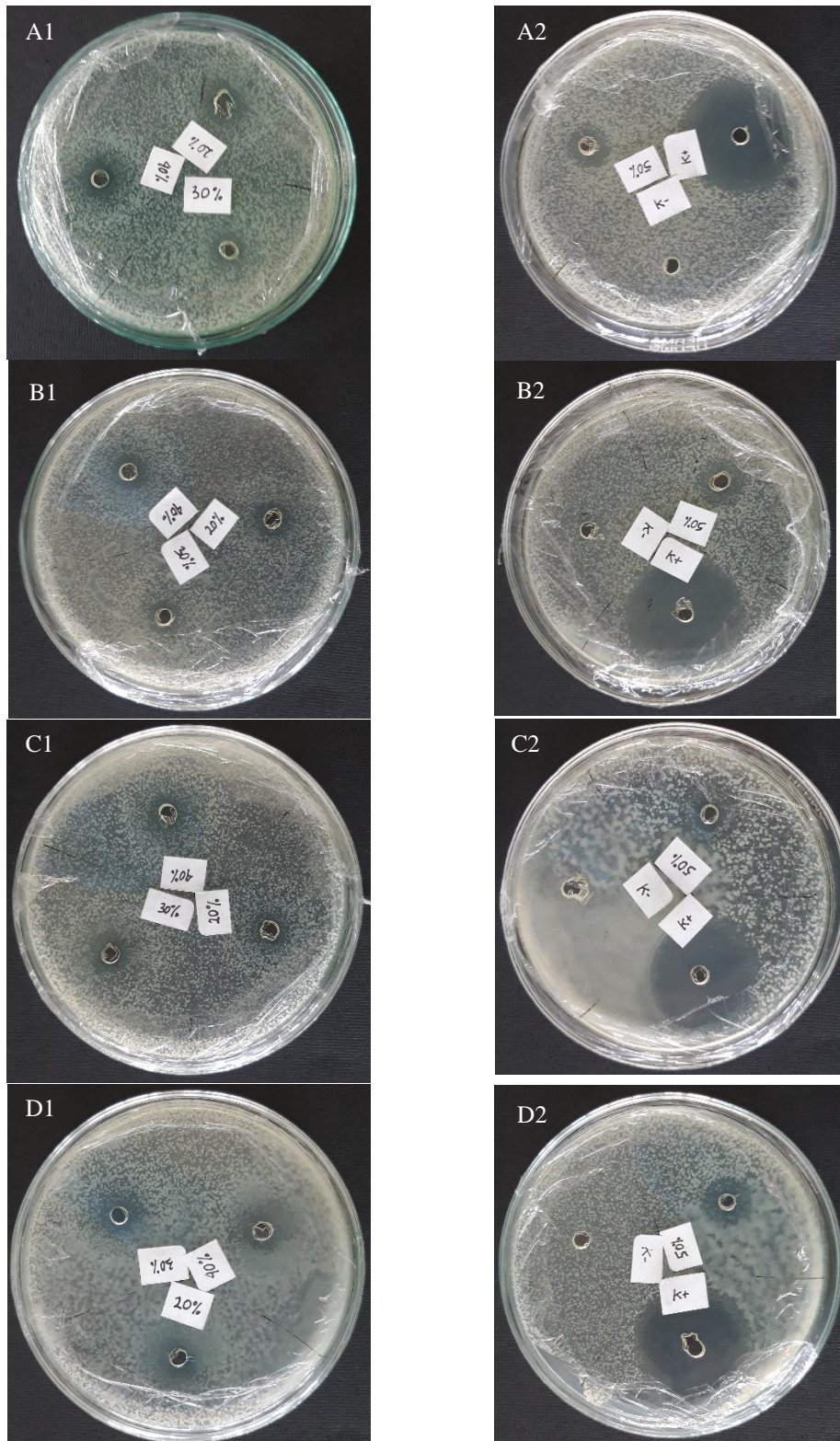
Uji TSIA



Konfirmasi ESBL



### Lampiran 16. Gambar Hasil Aktivitas Antibakteri



Keterangan:

A1: Ulangan 1  
(20%, 30%, 40%)

B1: Ulangan 2  
(20%, 30%, 40%)

C1: Ulangan 3  
(20%, 30%, 40%)

D1: Ulangan 4  
(20%, 30%, 40%)

A2: Ulangan 1  
(50%, K+, K-)

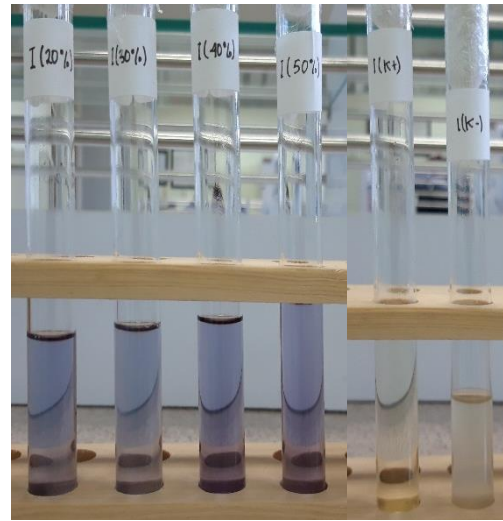
B2: Ulangan 2  
(50%, K+, K-)

C2: Ulangan 3  
(50%, K+, K-)

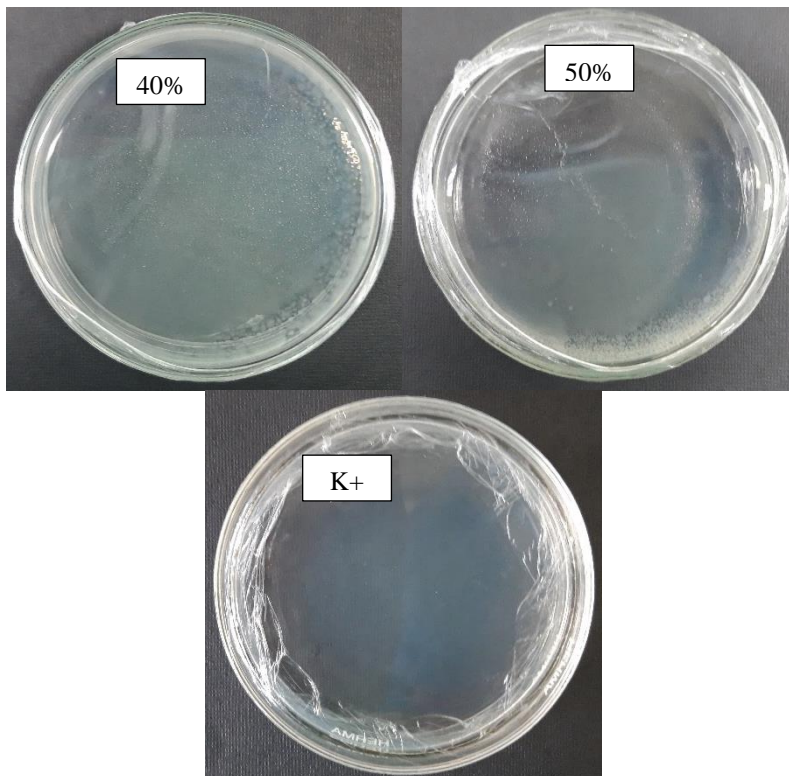
D2: Ulangan 4  
(50%, K+, K-)

**Lampiran 17. Gambar Hasil Uji KHM**

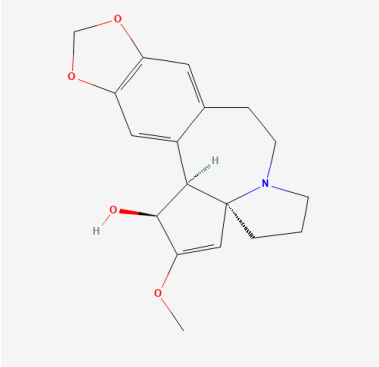
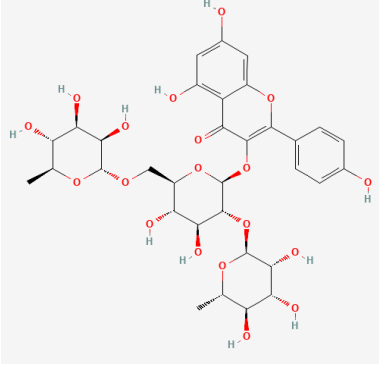
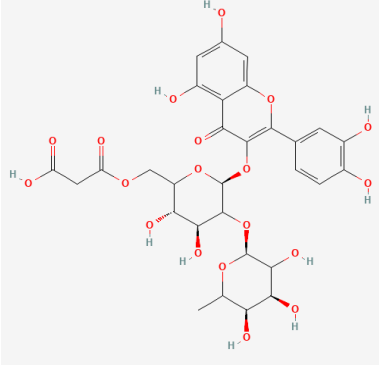
Sebelum Inkubasi

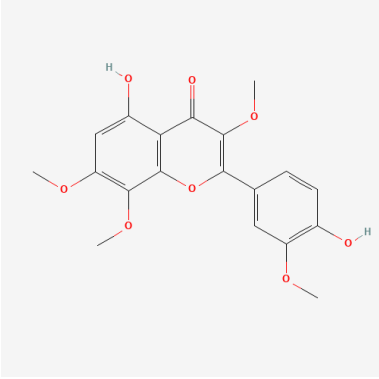
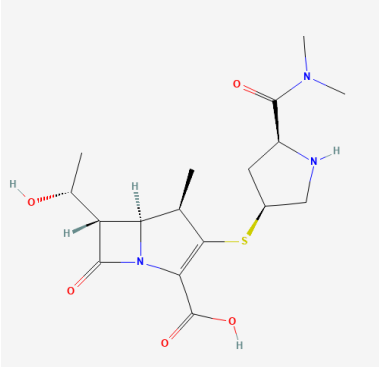


Sesudah Inkubasi

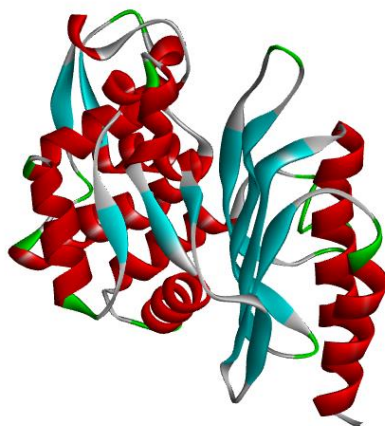
**Lampiran 18. Gambar Hasil Uji KBM**

## Lampiran 19. Struktur Ligan

CID Senyawa	Struktur	SMILES
65305	 <p data-bbox="619 745 807 779">Cephalotaxine</p>	<chem>COC1=CC23CCCN2CCC4=CC5=C(C=C4C3C1O)OC5O</chem>
11592917	 <p data-bbox="660 1164 766 1193">Clitorin</p>	<chem>CC1C(C(C(C(O1)O)C2C(C(C(C(O2)OC3=C(OC4=CC(=CC(=C4C3=O)O)O)C5=CC=C(C=C5)O)OC6C(C(C(C(O6)C)O)O)O)O)O)O</chem>
44258003	 <p data-bbox="539 1579 887 1644">Quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside)</p>	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OC2C(C(C(OC2OC3=C(OC4=CC(=CC(=C4C3=O)O)O)C5=CC(=C(C=C5)O)O)COC(=O)CC(=O)O)O)O)O)O</chem>

5459184	 <p style="text-align: center;">Ternatin</p>	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C2=C(C(=O)C3=C(O2)C(=C(C=C3O)OC)OC)OC)O</chem>
441130	 <p style="text-align: center;">Meropenem</p>	<chem>CC1C2C(C(=O)N2C(=C1SC3CC(NC3)C(=O)N(C)C)C(=O)O)C(C)O</chem>

### Lampiran 20. Struktur Reseptor



Struktur 3D Reseptor *Extended Spectrum β-Lactamase* (PDB ID: 6NVU)

**Lampiran 21. Data Nilai Energi Bebas ( $\Delta G$ ) Ligan – Reseptor**

No.	Senyawa Aktif	Model	Energi Bebas ( $\Delta G$ ) (kkal/mol)	rmsd/ub	rmsd/lb
1.	Meropenem	Model 1	-9.4	0	0
		Model 2	-9.2	5.75	2.923
		Model 3	-9.2	4.252	2.041
		Model 4	-9.2	6.043	3.001
		Model 5	-9.1	7.817	2.87
		Model 6	-8.9	8.879	2.519
		Model 7	-8.8	4.64	2.363
		Model 8	-8.8	7.358	2.409
2.	Cephalotaxine	Model 1	-7.9	0	0
		Model 2	-7	5.813	1.762
		Model 3	-7	6.134	2.402
		Model 4	-6.9	6.929	3.298
		Model 5	-6.5	5.937	1.971
		Model 6	-6.5	3.641	2.42
		Model 7	-6.5	3.669	2.096
		Model 8	-6.4	4.207	2.903
3.	Clitorin	Model 1	-8.4	0	0
		Model 2	-8.3	4.078	2.392
		Model 3	-8.2	4.066	1.869
		Model 4	-7.8	5.572	2.731
		Model 5	-7.8	7.545	3.68
		Model 6	-7.7	4.425	2.088
		Model 7	-7.4	6.867	3.412
		Model 8	-7.4	5.994	2.6
4.	Quercetin 3-(6''-malonylneohesperidoside)	Model 1	-8.5	0	0
		Model 2	-8.5	7.194	1.996
		Model 3	-8.4	4.354	1.668
		Model 4	-8.2	4.575	1.875
		Model 5	-8.1	8.846	2.749
		Model 6	-8	8.055	3.81
		Model 7	-7.8	8.397	3.471
		Model 8	-7.8	7.708	3.434
5.	Ternatin	Model 1	-7	0	0
		Model 2	-6.9	1.91	1.437
		Model 3	-6.8	2.623	2.32
		Model 4	-6.7	4.179	2.993
		Model 5	-6.6	2.689	2.176
		Model 6	-6.6	6.444	2.644
		Model 7	-6.5	1.758	1.606
		Model 8	-6.5	3.605	2.668

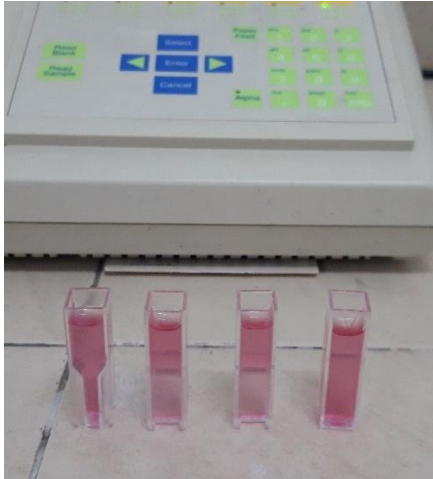
## Lampiran 22. Gambar Dokumentasi Penelitian

### Pembuatan kombucha bunga telang biru

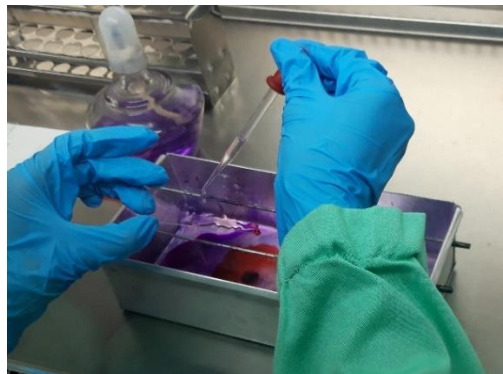
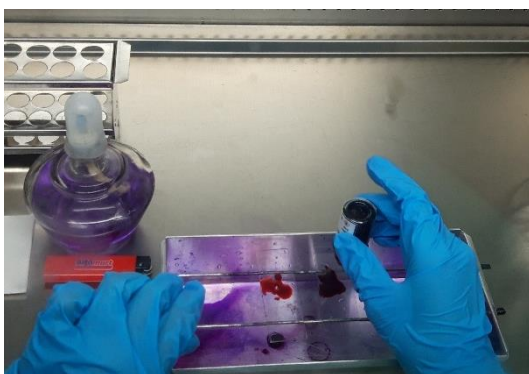
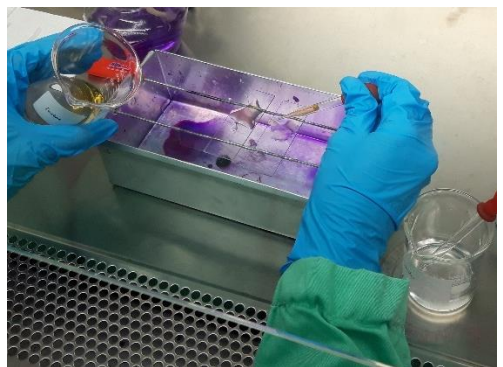
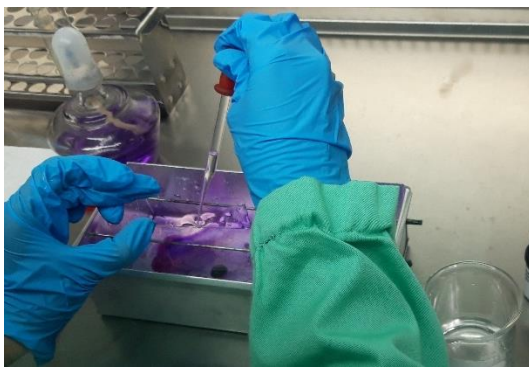
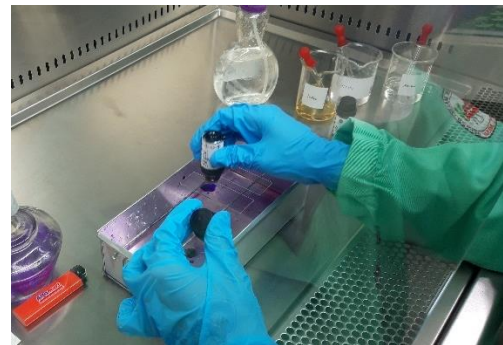


### Analisis Total Asam, pH, dan Antosianin Total

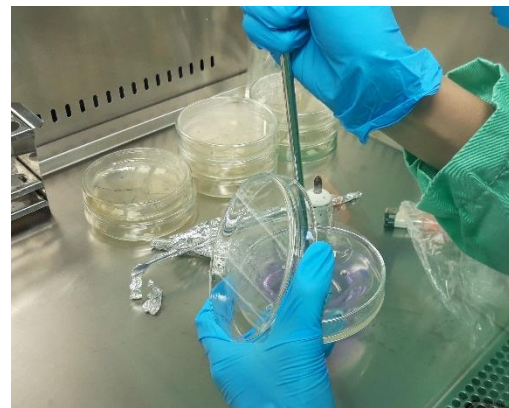
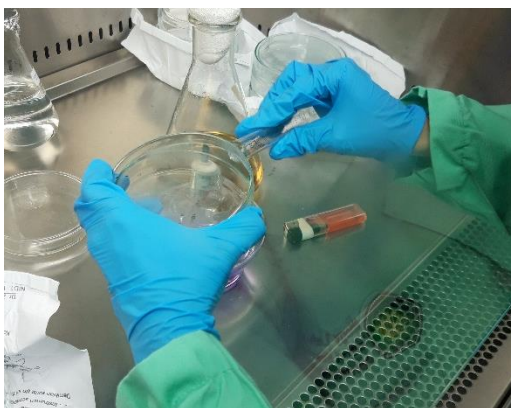
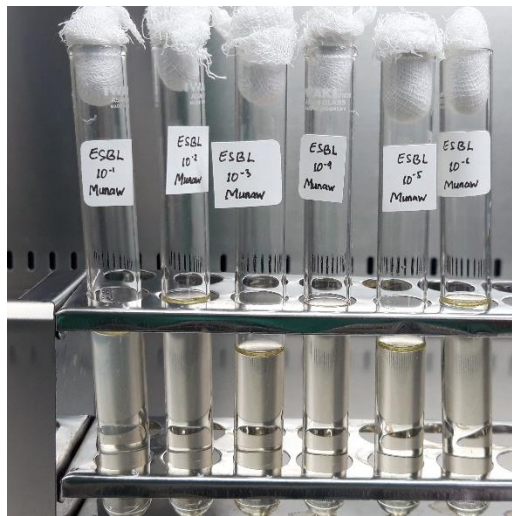
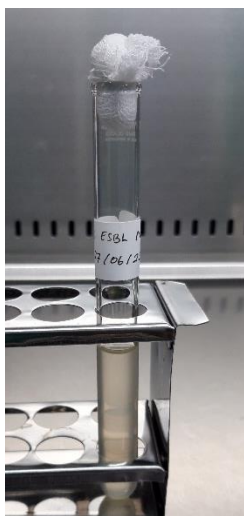
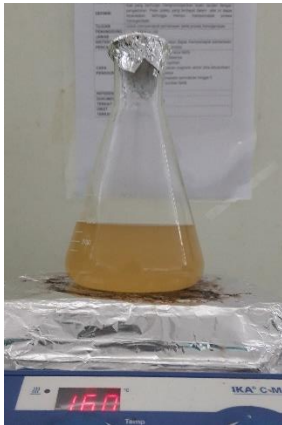




### Pewarnaan Gram



## Uji Aktivitas Antibakteri





## Lampiran 23. Kartu Konsultasi Skripsi



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

### KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Munawwarotul Khanifah  
NIM : 18620030  
Program Studi : S1 Biologi  
Semester : Ganjil TA 2022/2023  
Pembimbing : Prilya Dewi Fitrihasari, M. Sc.  
Judul Skripsi : Aktivitas Antibakteri Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Biru Terhadap *Escherichia coli* Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Penyebab Infeksi Saluran Kemih (ISK) secara *In Vitro* dan *In Silico*

No.	Tanggal Bimbingan	Deskripsi Bimbingan	TTD Pembimbing
1.	20 Agustus 2021	Bimbingan judul skripsi	
2.	18 Januari 2022	Bimbingan pengajuan judul skripsi baru, BAB I, dan BAB II	
3.	26 Januari 2022	Bimbingan BAB I, BAB II, dan BAB III	
4.	4 Februari 2022	Bimbingan BAB III	
5.	7 Februari 2022	Revisi dan ACC Seminar Proposal	
6.	26 Juli 2022	Bimbingan hasil data dan BAB IV	
7.	23 September 2022	Bimbingan BAB IV dan BAB V	
8.	30 September 2022	Bimbingan revisi BAB IV dan BAB V	
9.	7 Oktober 2022	ACC Skripsi	

Pembimbing Skripsi,

Prilya Dewi Fitrihasari, M. Sc.  
NIP. 19900428 2016080 1 2062



Malang, 7 Oktober 2022  
Program Studi,

Siska Sandi Savitri, M.P  
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA  
 UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
 FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
 PROGRAM STUDI BIOLOGI  
 Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

**KARTU KONSULTASI SKRIPSI**

Nama : Munawwarotul Khanifah  
 NIM : 18620030  
 Program Studi : S1 Biologi  
 Semester : Ganjil TA 2022/2023  
 Pembimbing : Dr. M. Imamuddin, Lc., MA.  
 Judul Skripsi : Aktivitas Antibakteri Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Biru  
 Terhadap *Escherichia coli* Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)  
 Penyebab Infeksi Saluran Kemih (ISK) secara *In Vitro* dan *In Silico*

No.	Tanggal Bimbingan	Deskripsi Bimbingan	Tanda Tangan Pembimbing
1.	3 Februari 2022	Bimbingan integrasi BAB I dan BAB II	
2.	7 Februari 2022	Revisi dan ACC Seminar Proposal	
3.	23 September 2022	Bimbingan integrasi BAB IV	
4.	30 September 2022	Bimbingan revisi integrasi BAB IV	
5.	4 Oktober 2022	Bimbingan revisi integrasi BAB IV dan ACC skripsi	

Pembimbing Skripsi,

Dr. M. Imamuddin, Lc., M.A.  
 NIP. 19740602 200901 1 010



Dr. Erika Sandi Savitri, M.P.  
 NIP. 19741018 200312 2 002

## Lampiran 24. Form Checklist Plagiasi




**KEMENTERIAN AGAMA**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**  
**PROGRAM STUDI BIOLOGI**

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933  
 Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

**Form Checklist Plagiasi**

Nama : Munawwarotul Khanifah  
 NIM : 18620030  
 Judul : Aktivitas Antibakteri Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Biru Terhadap *Escherichia coli* Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Penyebab Infeksi Saluran Kemih secara *In Vitro* dan *In Silico*

No	Tim Checkplagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	18%	
4	Dr. Maharani Retna Duhita, M.Sc.,  PhD. Med. Sc		



Departemen Biologi

**Dr. Evika Sandi Savitri, M. P**  
 NIP. 19741018 200312 2 002