

AKTIVITAS ANTIMIKROB DAN PENETAPAN LC_{50} EKSTRAK KASAR ETANOL DARI *PLIEK U* : MAKANAN FERMENTASI TRADISIONAL ACEH

Antimicrobial Activity and LC_{50} Determination of Ethanol Crude Extract of Pliiek U, an Achehnese Traditional Fermented Food

Nurliana¹, Mirnawati Sudarwanto², Lisdar I. Sudirman³,
dan Angelina W. Sanjaya²

¹ Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

² Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

³ Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor

ABSTRAK

Aktivitas antimikrob ekstrak kasar dari *pliek u* diuji terhadap lima spesies bakteri (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis dan *Pseudomonas aeruginosa*.) dan satu spesies fungi (*Candida albicans*). *Pliiek u* sudah dimanfaatkan sejak lama oleh masyarakat Aceh untuk dikonsumsi sebagai bumbu dan sambal serta dijadikan juga sebagai pakan ayam. *Pliiek u* diperoleh dari industri rumah tangga di desa Redeup, Aceh Besar Provinsi Aceh. Aktivitas ekstrak kasar etanol (EEP) diperoleh menggunakan metode standar. Deteksi aktivitas antimikrob EEP diuji menggunakan metode cakram kertas, sedangkan konsentrasi EEP ditetapkan menggunakan metode pengenceran. Uji *lethality test* menggunakan *Artemia salina* L. dilakukan untuk menetapkan konsentrasi LC_{50} EEP. Ekstrak kasar etanol (EEP) mempunyai aktivitas antimikrob terhadap semua mikrob uji. Konsentrasi aktivitas antimikrob EEP berdasarkan konsentrasi hambatan minimal (MIC) dan konsentrasi mikrobisid minimal (MMC) masing-masing adalah 2,5-10 mg/ml dan 10-20 mg/ml. Konsentrasi EEP yang menyebabkan kematian 50% (LC_{50}) *A. salina* L. adalah 3,36 mg/ml. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar etanol dari *pliek u* (EEP) berpotensi sangat baik dan tidak toksik sebagai antimikrob.

Kata kunci: *pliek u*, aktivitas antimikrob, *Artemia salina* L. *bioassay*

ABSTRACT

Antimicrobial activity of pliek u crude extracts was evaluated against five bacterial species (Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella enterica serovar Enteritidis and Pseudomonas aeruginosa,) and one fungal species (Candida albicans). Pliiek u has been consumed as spices and hot sauce and poultry feed. These foods were collected from household industry at Reudep village in Aceh Besar, Province of Aceh. The ethanol extract of pliek u were obtained by standard method. The antimicrobial activity was detected using paper disc method. The concentration of ethanol crude extract of pliek u (EEP) was determined with the dilution method. The lethality initial test has been detected by using Artemia salina L. bioassay to determine the toxic concentration based on the LC_{50} value of EEP. The ethanol crude extract (EEP) was active against all microbial strains. EEP showed antimicrobial activity at a minimum inhibitory concentration (MIC) and a minimum microbicidal concentration (MMC) at 2.5-10 mg/ml and 10-20 mg/ml, respectively. The lethality concentration EEP gave the LC_{50} value of 3.36 mg/ml. It was concluded that ethanol crude extract (EEP) shows significant antimicrobial activity and it is not toxic.

Keywords: *Pliiek u*, antimicrobial activity, *Artemia salina* L. *bioassay*

PENDAHULUAN

Ekstrak alami yang berbahan dasar tumbuh-tumbuhan banyak dimanfaatkan sebagai makanan, bumbu bahkan sebagai obat. Salah satu jenis tumbuh-tumbuhan yang sudah dimanfaatkan oleh masyarakat sejak ratusan tahun yang lalu adalah kelapa (*Cocos nucifera* L.), dengan memanfaatkan daging buah dan minyak kelapa sebagai makanan dan obat untuk

mengobati penyakit kulit, saluran pencernaan, penyakit kelamin hingga influenza (Fife, 2005). Komponen terbesar pada daging buah dan minyak kelapa adalah asam lemak jenuh (asam laurat 48-50%) yang berperan sebagai antibakteri, antijamur, antivirus dan antiprotozoa serta tidak toksik terhadap mukosa (Kabara, 2000). Indonesia merupakan salah satu negara yang menghasilkan beragam makanan fermentasi, diantaranya adalah *pliek u*

(produk fermentasi asal Aceh). *Pliek u* diperoleh dari daging buah kelapa yang difermentasi tanpa disengaja selama beberapa hari untuk mendapatkan minyak *pliek u* (Bakar *et al.*, 1985). Proses fermentasi makanan erat kaitannya dengan mikrob yang menyebabkan bahan mentah menjadi lebih baik dan juga diketahui menghasilkan senyawa antimikrob (Battcock dan Azam-Ali, 1998). Diduga selama proses pembuatan *pliek u* menghasilkan berbagai metabolit yang bisa terbentuk dari bahan asal ataupun juga dari hasil pengolahan (fermentasi).

Aktivitas suatu antimikrob tidak ada artinya apabila suatu antimikrob tidak efektif pada saat diaplikasikan. Pengujian efektivitas bahan obat mutlak dilakukan. Salah satu tahap awal yang sangat penting dilakukan adalah mengetahui efikasinya secara *in vivo* (Cowan, 1999).

Untuk mendukung manfaat *pliek u* sebagai sumber antimikrob, maka perlu dikaji aktivitas EEP dari *pliek u* berdasarkan konsentrasi efektifnya menghambat dan membunuh bakteri dan jamur serta toksisitasnya menggunakan *Artemia salina* L. Menurut Kanwar (2007), penggunaan metode tersebut dapat mengetahui *toksisitas senyawa antimikrob berdasarkan kemampuannya membunuh hingga 50% larva A. salina* L. Penelitian ini dilakukan untuk melengkapi informasi terhadap karakterisasi EEP yang memberikan aktivitas terbaik sebagai antimikrob.

MATERI DAN METODE

Pliek u

Pliek u yang merupakan bahan utama dalam penelitian ini diperoleh dari tempat produksi rumah tangga di desa Redeup, Aceh Besar, Provinsi Aceh.

Kultur Mikrob

Kultur mikrob terdiri dari *S. aureus* dan *E. coli* (isolat klinik berasal dari Laboratorium Bakteriologi FKH IPB, Bogor), *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, (isolat klinik berasal dari Laboratorium pribadi milik J. Sri Poernomo, Cimanggu, Bogor), *B. cereus* BCC 2118 dan *P. aeruginosa* BCC 2137 (isolate klinik berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian IPB, Bogor), dan *C. albicans* (isolat klinik berasal dari Laboratorium Mikologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor).

Ekstraksi *Pliek u*

Ekstraksi *pliek u* dikerjakan sesuai dengan prosedur Duraipandiyani *et al.* (2006) dan Sudirman (2005). *Pliek u* 20 g dalam 200 ml etanol 96% dicampur, kemudian *dishaker* pada kecepatan 130 rpm dan suhu 28 °C, selanjutnya disaring menggunakan *fritted glass filter*. Residu *pliek u* diekstraksi kembali sebanyak dua kali dengan cara yang sama. Filtrat dipekatkan menggunakan evaporator putar pada suhu 40-50 °C pada tekanan 175 mBAR. Ekstrak yang diperoleh dipekat ulang dengan kompresor udara menjadi EEP.

Uji Aktivitas Antimikrob (Metode Difusi Agar Cakram Kertas)

Pengujian aktivitas antimikrob EEP dikerjakan sesuai prosedur Sudirman (2005) menggunakan cakram kertas diameter 13 mm. Ekstrak EEP sebanyak 100 µl (99,0-100,5 mg) diteteskan di atas cakram kertas, dikeringkan pada suhu 40-42 °C, kemudian disterilisasi dengan sinar UV (254 nm) selama 30 menit. Cakram kertas diletakkan di atas media agar yang sesuai dengan mikrob uji (10^6 - 10^7 cfu/ml), dipreinkubasi pada suhu 10 °C selama 3 jam, lalu diinkubasi pada suhu pertumbuhan optimal masing-masing mikrob uji (bakteri 37 °C selama 24 jam, sedangkan untuk *C. albicans* pada suhu kamar (26-28 °C) selama 2-3 hari. Sebagai kontrol digunakan pelarut etanol dan antibiotik yaitu amoksisilin, kloramfenikol, tetrasiklin (25 µg/100 µl/ cakram kertas, Kimia Farma) dan Candistin (nystatin 10.000 IU/100 µl/ cakram kertas, Pharos). Kriteria aktivitas antimikrob berdasarkan Ela *et al.* (1996) yang disitasi dalam Elgayyar *et al.* (2001).

Penetapan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Microbicidal Concentration* (MMC)

Pengujian daya penghambat senyawa antimikrob dilakukan dalam media cair berdasarkan modifikasi dari prosedur Kim *et al.* (2004). Ekstrak EEP pada konsentrasi 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; dan 80 mg/ml ditambahkan ke dalam media cair Mueller-Hinton atau *potato dextrose* yang sudah diinokulasi mikrob uji 10^6 - 10^8 cfu/ml. Suhu inkubasi disesuaikan untuk masing-masing mikrob uji. Jumlah masing-masing mikrob (jumlah mikrob awal dan jumlah mikrob akhir setelah waktu inkubasi) dihitung berdasarkan metode hitung cawan menggunakan pengenceran desimal dari 1:10¹ – 1:10⁹ (Swanson *et al.*, 1992). Nilai MIC

dihitung menurut Kubo (1992) yakni konsentrasi terendah yang mampu menghambat mikroba (>90%), sedangkan MMC dihitung berdasarkan Courvalin *et al.* (1990) yang disitasi dalam Canillac dan Mourey (2001) yakni konsentrasi ekstrak yang menyebabkan mikroba yang hidup hanya 0,01 – 0,1%. Untuk mengetahui MIC dan MMC, dihitung dengan cara sebagai berikut :

$$\text{MIC}(\%) = 100\% - \frac{\text{Jumlah mikroba akhir}}{\text{Jumlah mikroba awal}} \times 100\%$$

$$\text{(MMC) \%} = \frac{\text{Jumlah mikroba akhir}}{\text{Jumlah mikroba awal}} \times 100\%$$

Penetapan Nilai LC₅₀ Menggunakan *Artemia salina* L. bioassay

Pengujian toksisitas EEP berdasarkan prosedur Khrisnaraju *et al.* (2005). Telur *A. salina* L. (1 g/l) diinkubasi selama 48 jam dalam air steril yang sudah dicampur dengan garam laut 35 g/l dengan pH 8.5. Larva aktif dilihat dibawah mikroskop stereo yang dilengkapi dengan Olympus optikal (4x10), kemudian diambil masing-masing sebanyak 10 ekor untuk setiap perlakuan dan dimasukkan dalam vial yang mengandung air garam laut. Perlakuan terdiri dari kontrol (air garam), penambahan EEP dengan konsentrasi 1,25; 2,5; 5; dan 10 mg/ml. Jumlah larva (hidup dan mati) dihitung setelah 24 jam inkubasi. Persentase kematian ditentukan berdasarkan Seen, (2005) dengan rumus :

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva hidup} + \text{jumlah larva mati}} \times 100$$

Analisis Data

Data dari hasil uji aktivitas antimikrob dan penentuan konsentrasi berdasarkan MIC dan MMC dianalisis secara deskriptif, sebelumnya data ditransformasikan terlebih dahulu menjadi log cfu. Data berupa rata-rata log cfu/ml ditampilkan dalam bentuk tabel.

Nilai LC₅₀ diplotkan menggunakan analisis persamaan regresi linier. Data yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk grafik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Antimikrob Ekstrak Kasar etanol dari *Pliek u* (EEP)

Aktivitas antimikrob ekstrak kasar etanol (EEP) menghasilkan zona hambatan yang bervariasi terhadap bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif dan *C. albicans* (Tabel 1). Berdasar kriteria aktivitas antimikrob yang dikemukakan oleh Ela *et al.* (1996) yang disitasi dalam Elgayyar *et al.* (2001), menunjukkan bahwa EEP merupakan senyawa antimikrob yang sangat aktif. Ketahanan dan sensitifitas mikroba terhadap antimikrob berbeda di antara spesies mikroba. Pengujian aktivitas antimikrob yang menggunakan metode difusi agar cakram kertas sangat dipengaruhi oleh jenis dan ukuran cakram kertas, pH dan sifat media, konsentrasi dan kemampuan antimikrob berdifusi ke dalam media, serta bahan lain yang terbawa dengan senyawa tersebut dan jenis mikroba yang digunakan (Branen, 1993).

Menurut Branen (1993) dan Kanazawa *et al.* (1995), aktivitas antimikrob juga dipengaruhi oleh polaritas senyawa antimikrob (sifat fisik antimikrob), yaitu sifat hidrofilik-lipofilik yang dapat mempengaruhi keseimbangan hidrofobik dinding sel mikroba sehingga aktivitasnya lebih maksimum. Pada umumnya tumbuh-tumbuhan obat dan bumbu yang diduga memberikan efek yang baik terhadap kesehatan mempunyai aktivitas antimikrob sangat baik setelah diekstrak dengan pelarut yang lebih polar seperti etanol dan metanol (Okeke *et al.*, 2001; Barbour *et al.*, 2004; Voravuthikunchai *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2004; Duraipandiyani *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2006; dan Rojas *et al.*, 2006).

Tabel 1. Aktivitas antimikrob minyak pliek u dan ekstrak kasar pliek u (EEP) terhadap bakteri dan *Candida albicans*

Jenis Antimikrob	Diameter Zona Hambatan (mm)*					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i> BCC 2118	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BCC 2137	<i>Candida albicans</i>
EEP	19.33 ± 0.47	20.33 ± 0.47	15.33 ± 0.47	23.33 ± 0.47	18.67 ± 1.24	10.67 ± 0.47
Amoksisilin	0	0	0	13.66 ± 1.24	0	TD
Kloramfenikol	0	21.33 ± 0.94	15.33 ± 0.47	22.66 ± 1.69	0	TD
Tetrasiklin	13.33 ± 0.94	12 ± 0	0	28.33 ± 0.47	0	TD
Nystatin	TD	TD	TD	TD	TD	13.67 ± 1.24

Keterangan: * (dikurangi dengan diameter kertas cakram 13 mm); TD (Tidak Diuji)

MIC dan MMC Ekstrak Kasar Etanol (EEP)

Penambahan berbagai konsentrasi EEP (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; dan 80 mg/ml) menyebabkan penurunan yang bervariasi dari jumlah masing-masing mikroba. Aktivitas suatu antimikroba sangat dipengaruhi oleh jenis antimikroba (konsentrasi dan polaritas), jenis mikroba dan cara uji (Maguire, 2000). Pada konsentrasi 20-80 mg/ml menyebabkan tidak ada pertumbuhan *P. aeruginosa*, konsentrasi 80 mg/ml tidak ada pertumbuhan *S. enterica* serovar Enteritidis dan konsentrasi 40-80 mg/ml tidak ada pertumbuhan *C. albicans*.

Berdasarkan penentuan nilai MIC menunjukkan bahwa *E. coli* sangat sensitif terhadap EEP dibandingkan mikroba uji lainnya, sedangkan *B. cereus* dan *S. enterica* serovar Enteritidis sangat tahan, karena membutuhkan EEP dengan konsentrasi paling besar (Tabel 2). Konsentrasi mikrobisida yang menyebabkan kematian mikroba uji berkisar 10-20 mg/ml, yaitu pada konsentrasi 10 mg/ml untuk bakteri, sedangkan untuk *C. albicans* adalah 20 mg/ml.

Apabila dianalogkan dengan antibiotik berdasarkan ratio MMC/MIC 4 maka spesies mikroba dikategorikan *susceptible* dan jika rasionya >4 digolongkan lebih toleran (Courvalin *et al.*, 1990 yang disitasi dalam Canillac dan Mourey, 2001). Apabila 1 < ratio MMC/MIC < 8 maka antimikroba digolongkan bersifat bakteristatik. Berdasarkan klasifikasi tersebut *B. cereus* tergolong lebih toleran terhadap EEP, sedangkan *S. aureus*, *S. enterica* serovar Enteritidis, *E. coli*, *P. aeruginosa* dan *C. albicans* digolongkan spesies yang rentan (*susceptible*) terhadap EEP.

Sensitifitas mikroba juga sangat dipengaruhi oleh jenis mikroba (*strain* yang berbeda), jumlah awal mikroba dan bahan antimikroba yang digunakan serta fase pertumbuhan mikroba (Entani *et al.*, 1998). Agen antimikroba mempunyai pengaruh yang kecil pada saat proses sintesis sel selama fase statis, sehingga tidak semua mikroba akan menurun jumlahnya dengan dosis MIC. Pertumbuhan sel-sel pada fase log atau fase eksponensial lebih sensitif dan lebih mudah dibunuh dibandingkan pada fase stasioner (Corre *et al.*, 1990 yang disitasi dalam Carson *et al.*, 2002).

Aktivitas antimikroba juga dipengaruhi oleh komponen-komponen yang terkandung didalamnya dan interaksinya dengan dinding sel dan membran mikroba. Interaksi dengan struktur hidrofobik merupakan kunci utama aksi antimikroba hidrokarbon (Sikkema *et al.*, 1995). Menurut Kabara (2000), aktivitas antibakteri dari monogliserida dan asam lemak bebas adalah dengan merusak pertahanan permeabilitas membran sel dan menghambat pengambilan asam amino. Aktivitas minyak esensial disebabkan oleh komponen dalam minyak yang merusak membran dan dinding sel *Bacillus subtilis* dan *E. coli* (Rhayour *et al.*, 2002). Efektivitas suatu antimikroba sangat tergantung pada kemampuannya mencapai target sasaran, terutama terhadap bagian-bagian sel sasaran (Hogan, 2003). Efek antibakteri pada membran bakteri menyebabkan kerusakan atau autolisis menyebabkan terhambatnya pertumbuhan bahkan kematian sel (Ahn *et al.*, 2004).

Tabel 2. MIC dan MMC EEP terhadap bakteri dan *Candida albicans*

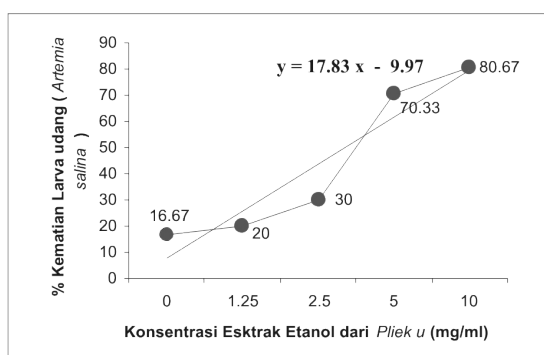
Mikroba	Jumlah mikroba Awal	Jumlah mikroba akhir	MIC (mg/ml)	MMC (mg/ml)	MMC/MIC *
<i>Bacillus cereus</i>	1,4 x 10 ⁶ (6.14 log)	3,2 x 10 ⁴ (4.5 log) 3,8 x 10 ² (2.57 log)	10	80	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,6 x 10 ⁷ (7.41 log)	3,28 x 10 ⁴ (4.51 log) 3,5 x 10 ³ (3.54 log)	5	10	2
<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	1,8 x 10 ⁷ (7.25 log)	2,8 x 10 ⁶ (6.44 log) 1,2 x 10 ² (2.07 log)	10	20	2
<i>Escherichia coli</i>	(2,5) x 10 ⁸ (8.39 log)	2,9 x 10 ⁶ (6.46 log) 4,4 x 10 ³ (3.54 log)	2.5	10	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0 x 10 ⁷ (7.3 log)	2,9 x 10 ⁴ (4.46 log) 6,0 x 10 ¹ (1.77 log)	5	10	2
<i>Candida albicans</i>	2,5 x 10 ⁵ (5.39 log)	2,8 x 10 ³ (3.44 log) 2,0 x 10 ¹ (1.3 log)	5	20	4

Keterangan: Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimal Microbicidal Concentration (MMC);

* Susceptible 4, Tolerance >4, 1 < bakteristatik <8

Nilai LC₅₀ EEP Berdasarkan *A. salina* L. Bioassay

Uji toksisitas awal EEP terhadap larva *A. salina* L. setelah 24 jam inkubasi, menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi EEP menyebabkan peningkatan persentase kematian larva (Gambar 1). Suatu ekstrak dikatakan toksik jika memiliki nilai LC₅₀ (konsentrasi yang mampu membunuh 50% larva *A. salina* L.) <1000 µg/ml untuk ekstrak kasar dan <200 µg/ml untuk ekstrak murni setelah waktu kontak 24 jam (Meyer *et al.*, 1982). Nilai LC₅₀ EEP diperoleh berdasarkan analisis persamaan regresi linier adalah 3.36 mg/ml (Gambar 1), artinya dosis tersebut tidak toksik terhadap *A. salina* L. Toksisitas suatu bahan juga dipengaruhi jenis ekstraknya dan komponen yang terdapat dalam ekstrak. Menurut Chaudhry *et al.*, (2003), tumbuhan obat yang diekstrak dengan metanol tidak memperlihatkan aktivitas biologi pada uji *brine shrimp* bioassay dibandingkan dengan ekstrak diklorometan. Akan tetapi ekstrak air dari akar dan batang tumbuhan *Terminalia brownii* memiliki aktivitas toksik yang sangat tinggi (Mbwambo *et al.*, 2007).



Gambar 1. Pengaruh berbagai konsentrasi EEP terhadap larva *Artemia salina* L

Penelitian terhadap toksisitas ekstrak kasar etanol (EEP) menghasilkan uji yang cepat dan sangat sederhana. Penentuan tahap awal suatu bahan yang diduga toksik terhadap konsentrasi moderat dan tinggi dapat dideteksi dengan bioassay menggunakan *Artemia salina* L., dimana suatu senyawa yang toksik bisa menjadi tidak toksik apabila digunakan hewan coba yang lebih besar (Kiviranta *et al.*, 2007). Pengujian dengan *brine shrimp* bioassay menggunakan larva *Artemia salina* L. sangat mendukung penggunaan tumbuh-tumbuhan obat, sehingga metode ini bisa dijadikan untuk pengujian bioaktivitas dan toksisitas bahan uji (Khrisnaraju *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol kasar dari *pliek u* (EEP) berpotensi sebagai senyawa antimikrob pada konsentrasi MIC (2,5-10 mg/ml) dan MMC (10-20 mg/ml) serta tidak toksik pada konsentrasi 3.36 mg/ml, namun penelitian ini perlu dilanjutkan terhadap efektivitasnya sebagai obat dengan berbagai cara aplikasi penggunaannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, J., I.U. Grun and A. Mustapha. 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. **Journal of Food Protection**. 67(1):148-155.
- Bakar, A., B. Sulaiman, M.A. Hanafiah, Z.A. Ibrahim dan H. Syarifah. 1985. **Kamus Aceh Indonesia 2 Seri 2 M-Y**. Pusat Pembinaan dan Pengembangan Bahasa, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Jakarta.
- Barbour, E.K., M. Al Sharif, V.K. Sagherian, A.N. Habre, R.S. Talhouk and S.N. Talhouk. 2004. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. 93(1):1-7.
- Battcock, M. And S. Azam-Ali. 1998. Fermented fruits and vegetables a global perspective. **FAO Agricultural Services Bulletin** 134. Food and Agriculture Organization United Nation, Rome, Itali.
- Branen, A.L. 1993. Introduction to Use of Antimicrobials. In **Antimicrobials in Foods**. P.M. Davidson and A.L. Branen (ed). 2nd Marcell Dekker, Inc. New York, Basel.
- Canillac, N. and A. Mourey. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**. 18:261-268.
- Carson, C.F., B.J. Mee and T.V. Riley. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 6:1914-1920.
- Chaudry, B.A., M.Y. Syad, K.H. Janbaz, A.A. Dasti and B.A. Loothar. 2003. Biological activities of *Polygonum barbatum*. **Journal of Research Science**. 14(2): 169-175.

- Corre, J., J.J. Lucchini, G.M. Mercier, and A.Cremieux. 1990. Antibacterial activity of phenethyl alcohol and resulting membrane alterations. **Research Microbiology**. 141:483-497.
- Courvalin, P., H. Drugeon, J.P. Flandrois, and F. Goldstein. 1990. **Bactéricidie. Aspects Théoriques et Thérapeutiques**. Paris. Maloine.
- Cowan, MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology**. 10:564-582.
- Duraipandiyan, V., M. Ayyanar, and S. Ignacimuthu. 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6:35. [terhubung berkala]. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/35>.
- Entani, E., M. Asai, S. Tsujihata, Y. Tsukamoto, and M. Ohta. 1998. Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**. 61(8):953-959.
- Ela, M.A., N.S. El-Shaer, and N.B. Ghanem. 1996. Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. **Pharmazie**. 51:993-995.
- Elgayyar, M., F.A. Draughon, D.A. Golden, and J.R. Mount. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**. 64(7):1019-1024.
- Fife, B. 2005. Makan Agar Menjadi Lebih Sehat. In: **Coconut Oil Miracle**, F.U. Ardi (ed) 2nd. A. Rahmalia, penerjemah. PT Bhuana Ilmu Populer kelompok Gramedia. Jakarta.
- Gupta, M., U.K. Mazumder, P. Gomathi, and V.T. Selvan. 2006. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6:36. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/36>.
- Hogan, J. 2003. Resistance of microbial cells to antimicrobial agents by efflux. **Trinity student medicinal journal**.
- Kabara, J. J. 2000. Health oils from the tree of life (nutritional and health aspects of coconut oil). In **Sustainable Coconut Industry in the 21st Century**. Proceeding of the XXXVII cocotech Meeting/ICC 2000;Chennai 24-28 Juli 2000, 2000, India: APCC Asian and Pacific Coconut Community.
- Kanazawa, A, T. Ikeda, and T. Endo. 1995. A Novel approach to made of action on cationic biocides: morphology effect on antibacterial activity. **Journal of Applied Bacteriology**. 78:55-60.
- Kanwar, A.S. 2007. Brine shrimp '*Artemia salina*' a marine animal for simple and rapid biological assays. (Review). **Journal of Chinese Clinical Medicine**. 2 (4) . <http://www.cjmed.net/html/2007424-63.html?PHP>.
- Kim, J.W., Y.S. Kim, and K.H. Kyung. 2004. Inhibitory activity of Essential oils of garlic and onion against bacteria and yeast. **Journal of Food Protection**. 67(3):499-504.
- Kiviranta, J. K. Sivonen, S.I. Niemela, and K. Huovinen. 2007. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/112502097>.
- Krishnaraju, A.V., T.V.N. Rao, D. Sundararaju, M. Vanisree, T.S. Hsin-Sheng, and G.V. Subbaraju. 2005. Assesment of bioactivity of Indian meadicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. **International Journal of Applied Science Engenering**. 3(2): 125-134.
- Kubo, I. 1992. Antimicrobial Activity of Green Tea Flavour Components (Effectiveness against *Streptococcus mutans*) In: **Bioactive Volatile Compounds for Plants**. R. Teranishi, R.G. Buttery, H. Sugisama (ed). American Chemical Society, Washington.
- Mbwambo, Z.H., M.J. Moshi, P.J. Masimba, M.C. Kapingu, and R.S.O. Nondo. 2007. Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of *Terminalia brownii* roots and stem. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 7:2 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/7/9>.
- Maguire, M. 2000. Re:How do Essential Oil Interact with Bacteria to Suppress Bacterial growth? MadSci Network:Biochemistry. Webad min@www.madsci.org.
- Meyer, B.N., N.R.Ferigni, J.E. Putnam, L.B. Ja Cobsen, D.E. Nichols, and J.L. McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Conventient General Bioassay for Active Plant Constituent. **Planta Medica**. 45:31:45.

- Okeke, M.I., C.U.Iroegbu, C.O. Jideofor, A.S. Okoli, and C.O. Esimone. 2001. Antimicrobial activity of ethanol extracts of two indigenous Nigerian spices. **Journal of Herbs and Spices Medicinal Plants**. 8(4):39-46.
- Rhayour, Khadija, Bouchikhi, Touria, Tantaoui-Elaraki, Abdelrhafour, Sendide, Khalid, Remmal, and Adnane. 2003. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**. 7-8.
- Rojas, J.J., V.J. Ochoa, S.A. Ocampo, and J.F. Munoz. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary Alternative and Medicine**. 6:2. <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/2>.
- Seen, A. 2005. Toxicity testing (Teacher notes). Australian School Innovation in Science, Technology and Mathematics Project. <http://www.cyut.edu.tw/~ijase/2005/IJA SE203-2-6.pdf>.
- Shah, A., R.F. Cross, and E.A. Palombo. 2004. Identification of the antibacterial component of an ethanolic extract of the Australian medicinal plant, *Eremophila duttoni*. **Phytotherapy Research**. 18(8):615-618.
- Sikkema, J., J.A.M. de Bont, and B. Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Review**. 59:201-222.
- Sudirman, L.I. 2005. Antimicrobial compounds from tropical mushrooms. **International Seminar on Microbial Biotechnology and Bioprospecting**. Jakarta, 3 Des. Fakultas Biotechnology, Universitas Katolik Atmajaya.
- Swanson, K.M.J., F.F. Busta, E.H. Peterson, and M.G. Johnson. 1992. *Colony Count Methods*. In **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. C. Vanderzant and D.F. Splittstoesser (ed). 3rd. American Public Health Ass. USA.
- Voravuthikunchai, S., A. Lortheeranuwat, W. Jeeju, T. Sririrak, S. Phongpaichit, and T. Supawita. 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. **Journal of Ethnopharmacology**. 94(1):49-54.