

## **NASKAH PUBLIKASI**

# **UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) TERHADAP *Shigella flexneri* SECARA IN VITRO**



**ERIKA FITRIANI**

**I11110046**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS TANJUNGPURA  
2014**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**NASKAH PUBLIKASI**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK  
(*Annona muricata* L.) TERHADAP *Shigella flexneri*  
SECARA IN VITRO**

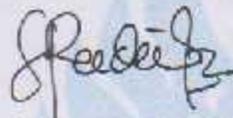
**TANGGUNG JAWAB YURIDIS MATERIAL PADA**

**ERIKA FITRIANI**

**NIM 111110046**

**DISETUJUI OLEH**

**PEMBIMBING UTAMA**



**Hj. Sri Wahdaningsih, M. Sc., Apt**  
**NIP. 19811101 200801 2 011**

**PEMBIMBING KEDUA**



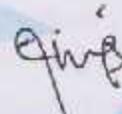
**dr. Ambar Rialita, Sp. KK**  
**NIP. 19691025 200812 2 002**

**PENGUJI PERTAMA**



**dr. M. In'am Ilmiawan, M. Biomed**  
**NIP. 19791018 200604 1 002**

**PENGUJI KEDUA**



**dr. Delima Fajar Liana**  
**NIP. 19861205 201212 2 001**



**MENGETAHUI,  
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS TANJUNGPURA**

**dr. Bambang Sri Nugroho, Sp.PD**  
**NIP. 19541218 197811 1 001**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK  
(*Annona muricata* L.) TERHADAP *Shigella flexneri*  
SECARA IN VITRO**

Erika Fitriani<sup>1</sup>; Sri Wahdaningsih<sup>2</sup>; Ambar Rialita<sup>3</sup>

**Intisari**

**Latar Belakang:** Penyakit diare masih merupakan masalah kesehatan di negara berkembang seperti di Indonesia karena angka kesakitannya masih tinggi. Penyakit diare dapat menjadi lebih parah jika terjadi diare berdarah atau disebut juga shigellosis. Tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) telah digunakan secara turun temurun oleh sebagian masyarakat Indonesia untuk mengobati penyakit. Masyarakat Kutai di Kalimantan memilih daun sirsak untuk mengobati diare. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak terhadap *Shigella flexneri*, menentukan kandungan senyawa metabolit sekunder, dan menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun sirsak dalam menghambat pertumbuhan *Shigella flexneri*. **Metodologi:** Daun sirsak diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan skrining fitokimia. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*. Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi yaitu 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, dan 1000 mg/mL. Kontrol positif menggunakan siprofloksasin 5 µg/disk sedangkan kontrol negatif menggunakan DMSO 10%. **Hasil:** Berdasarkan skrining fitokimia, ekstrak etanol daun sirsak mengandung senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, tanin, dan triterpenoid. Ekstrak etanol daun sirsak tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri*. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol daun sirsak tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella flexneri*.

**Kata Kunci:** Antibakteri, Ekstrak etanol daun sirsak, *Shigella flexneri*

- 1) Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat.
- 2) Departemen Biologi Farmasi, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat.
- 3) Departemen Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Kalimantan Barat.

**IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF ETHANOL  
EXTRACTS OF SOURSOP LEAVES (*Annona muricata* L.)  
AGAINST *Shigella flexneri***

Erika Fitriani<sup>1</sup>; Sri Wahdaningsih<sup>2</sup>; Ambar Rialita<sup>3</sup>

**Abstract**

**Background:** *Diarrhea remains cause of health problem in developing countries such as Indonesia because the mortality rate keep increasing. Diarrhea could be more serious when it becomes bloody diarrhea or also known as shigellosis. Soursop (*Annona muricata* L.) has been used by most of Indonesian people to treat many diseases. The society of Kutai in Kalimantan choosed soursop leaves to treat diarrhea.* **Objective:** *The aim of this study was to investigate the antibacterial activity of ethanol extracts of soursop leaves against *Shigella flexneri*, determined the secondary metabolite compounds, and determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of ethanol extracts of soursop leaves to inhibit the growth of *Shigella flexneri*.* **Method:** *Soursop leaves was extracted by maceration method using 70% ethanol. Chemical compounds of this extract were determined by phytochemical screening. Antibacterial activity test was determined by Kirby-Bauer Disc Diffusion method. This study used various concentration consist of 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, and 1000 mg/mL. Ciprofloxacin 5 µg/disk was used as positive control while negative control used DMSO 10%.* **Result:** *Based on phytochemical screening, ethanol extracts of soursop leaves contained alkaloids, phenols, flavonoids, saponins, tannins, and triterpenoids. Ethanol extracts of soursop leaves didn't showed antibacterial activity against the growth of *Shigella flexneri*.* **Conclusion:** *Ethanol extracts of soursop leaves didn't has antibacterial activity against *Shigella flexneri*.*

**Keywords:** *Antibacterial, Ethanol extracts of soursop leaves, *Shigella flexneri**

- 1) *Medical School, Faculty of Medicine, Tanjungpura University, Pontianak, West Kalimantan.*
- 2) *Departement of Biology Pharmacy, Departement of Pharmacy, Faculty of Medicine, Tanjungpura University, Pontianak, West Kalimantan.*
- 3) *Departement of Dermatovenerology, Medical School, Faculty of Medicine, Tanjungpura University, Pontianak, West Kalimantan.*

## LATAR BELAKANG

Penyakit diare masih merupakan masalah kesehatan di negara berkembang seperti di Indonesia karena angka kesakitannya masih tinggi. Hal ini dapat dilihat dari survei angka kesakitan yang dilakukan oleh Subdit Diare Departemen Kesehatan, yang menunjukkan kecenderungan meningkatnya angka kesakitan diare dari tahun 2000 sampai 2010. Insiden rata-rata penyakit diare pada tahun 2000 sebesar 301 per 1000 penduduk, naik menjadi 411 per 1000 penduduk pada tahun 2010.<sup>1</sup> Tingginya angka kesakitan diare dihubungkan dengan kepadatan penduduk dan kebersihan yang masih kurang. Penyakit diare dapat menjadi lebih parah jika terjadi diare berdarah atau disebut juga shigellosis.<sup>2,3</sup> Penelitian yang dilakukan Herwana *et al.* (2010) pada Februari 2005 sampai September 2007 di Jakarta Selatan terhadap 612 anak usia 0-12 tahun yang mengalami diare menunjukkan 9,3% pasien disebabkan oleh *Shigella* sp. dan *Shigella flexneri* merupakan spesies yang paling sering ditemukan dengan prevalensi sebesar 63,2%.<sup>4</sup>

Tanaman sirsak telah digunakan secara turun temurun oleh sebagian masyarakat Indonesia untuk mengobati penyakit. Masyarakat Kutai di Kalimantan memilih daun sirsak untuk mengobati diare. Penggunaan daun sirsak secara empiris di masyarakat yaitu dengan cara direbus, baik daun yang masih segar maupun yang sudah dikeringkan terlebih dahulu.<sup>5</sup>

Beberapa penelitian telah membuktikan khasiat dari tanaman sirsak. Pathak *et al.* (2010) melaporkan bahwa ekstrak air dan metanol daun sirsak mengandung senyawa tanin, steroid, dan glikosida yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* dan *Enterobacter aerogenes*.<sup>6</sup> Sari *et al.* (2010) melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari infusa daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan metode kromatografi lapis tipis menemukan senyawa flavonoid, polifenol dan alkaloid yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.<sup>7</sup>

Aktivitas antibakteri yang terdapat pada daun sirsak menjadi dasar dilakukannya penelitian untuk mencari aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap salah satu bakteri penyebab shigellosis yaitu *Shigella flexneri* secara *in vitro* menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer. Ekstrak etanol daun sirsak diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Etanol merupakan pelarut yang bersifat semipolar yang artinya dapat melarutkan senyawa polar maupun senyawa nonpolar.<sup>8</sup> Penggunaan bagian daun sirsak dikarenakan adanya data empiris yang menerangkan bahwa daun sirsak dapat digunakan sebagai antidiare.

## **METODE**

### **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Februari hingga bulan Agustus 2014. Sampel daun sirsak diperoleh dari perkebunan daerah Rasau Jaya, Kabupaten Kubu Raya, Kalimantan Barat. Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknologi Kayu Fakultas Kehutanan, Universitas Tanjungpura Pontianak. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tanjungpura Pontianak.

### **Alat Penelitian**

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain oven (memmert<sup>®</sup>), *blender* (Waring<sup>®</sup>), bejana maserasi, elenmeyer 1000 mL (Pyrex<sup>®</sup>), corong kaca (Pyrex<sup>®</sup>), batang pengaduk, *vacuum rotary evaporator* (Yamato<sup>®</sup>), cawan penguap (Pyrex<sup>®</sup>), *water bath* (Mettler<sup>®</sup>), timbangan analitik (Mettler Toledo<sup>®</sup>), tabung reaksi (Pyrex<sup>®</sup>), penjepit dan rak tabung reaksi, cawan porselen, desikator, gelas ukur 100 mL (Pyrex<sup>®</sup>), gelas beker 100 mL dan 250 mL (Pyrex<sup>®</sup>), pipet tetes, pipet ukur (Pyrex<sup>®</sup>), vial, *object glass*, *cover glass*, jarum ose, bunsen, mikroskop (Labomed<sup>®</sup>), vortex, *Hot Plate* (Kikalabortechnik<sup>®</sup>), autoklaf (ALP<sup>®</sup>), tip dan mikropipet (Transferpette<sup>®</sup>), cawan petri (Pyrex<sup>®</sup>), pinset (Renz<sup>®</sup>), *Biological Safety*

*Cabinet (BSC)* (Biobase®), lemari pendingin (LG®), inkubator (Mettler®), jangka sorong (Mitutoyo®) dan spektrofotometri (Genesys 6®).

### **Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain daun sirsak, akuades, aluminium foil (Carrefour®), siprofloksasin 5 µg/disk (Oxoid®) sebagai kontrol positif, DMSO 10% (sebagai kontrol negatif), kertas cakram steril, kertas saring, etanol 70%, spiritus, kertas sampul coklat, kapas, plastik tahan panas, pereaksi Mayer (Merck®), pereaksi Dragendorff (Merck®), pereaksi Wagner (Merck®), kalium iodida (KI) (Merck®), magnesium (Mg) (Merck®), asam klorida (HCl) pekat (Merck®), besi (III) klorida (FeCl<sub>3</sub>) 1% (Merck®), asam asetat (CH<sub>3</sub>COOH) glasial (Merck®), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (Merck®), kloroform (CH<sub>3</sub>Cl) (Merck®), media *Nutrient Agar* (NA), media agar *Salmonella Shigella* (SS) (Pronadisa®), media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) (Pronadisa®), media *Mueller-Hinton agar* (MHA) (Pronadisa®), media *Simmons Citrate Agar* (SCA) (Pronadisa®), media MIO (*Motility-Indole-Ornithine*) (Pronadisa®), media urease (Pronadisa®), media Glukosa Of (*Hugh Leifson*) (Pronadisa®), manitol, standar Mc. Farland no. 0,5, karbol kristal ungu, etanol 96%, iodin, safranin, spiritus dan larutan natrium klorida (NaCl) 0,9%.

### **Bakteri Uji**

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu kultur murni *Shigella flexneri* ATCC 12022 yang didapat dari koleksi Balai Laboratorium Kesehatan (ULK) Yogyakarta.

### **Rancangan Percobaan**

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang digunakan yaitu 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, dan 1000 mg/mL. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik siprofloksasin 5 µg/disk dan kontrol negatif DMSO 10%.

## **Prosedur Kerja**

### **Pengolahan Sampel**

Sampel, yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirsak. Daun sirsak yang telah dikumpulkan, disortasi basah, kemudian dicuci menggunakan air mengalir sampai bersih, dirajang, dikeringanginkan kemudian di oven pada suhu 50°C selama 24 jam, simplisia disortasi kering, selanjutnya dijadikan serbuk dengan menggunakan *blender* dan dilakukan pengepakan dan penyimpanan.

### **Ekstraksi**

Sebanyak 500 gram serbuk simplisia daun sirsak dimasukkan kedalam bejana maserasi kemudian dilakukan maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% sampai serbuk simplisia terendam semua. Kemudian ditutup dan didiamkan sambil sesekali diaduk. Proses maserasi dilakukan dengan mengganti pelarut tiap 1x24 jam selama tiga hari. Hasil maserasi dikumpulkan dan disaring. Filtratnya kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak etanol daun sirsak. Pengentalan ekstrak dilanjutkan menggunakan *water bath*. Ekstrak kemudian disimpan dalam wadah kaca yang dilapisi aluminium foil.

## **Skrining Fitokimia**

### **Pemeriksaan Alkaloid**

Ekstrak sampel masing-masing sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur dengan 5 mL kloroform dan 5 mL amoniak kemudian dipanaskan, dikocok dan disaring. Ditambahkan 5 tetes asam sulfat pada masing-masing filtrat, kemudian kocok dan didiamkan. Bagian atas dari masing-masing filtrat diambil dan diuji dengan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendroff. Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer, endapan coklat pada pereaksi Wagner, dan endapan orange atau jingga pada pereaksi Dragendroff menunjukkan adanya alkaloid.<sup>9,10,11</sup>

### **Pemeriksaan Fenol**

Ekstrak sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan beberapa tetes air panas dan beberapa tetes pereaksi  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika warna larutan berubah menjadi warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat menunjukkan adanya senyawa fenol.<sup>12</sup>

### **Pemeriksaan Flavonoid**

Ekstrak Sampel dicampur dengan 5 mL etanol, dikocok, dipanaskan, dan dikocok lagi kemudian disaring. Kemudian ditambahkan Mg 0,2 g dan 3 tetes HCl pada masing-masing filtrat. Jika terjadi perubahan warna menjadi jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya favonoid. Jika warna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkon dan auron.<sup>10,13</sup>

### **Pemeriksaan Tanin**

Ekstrak sampel masing-masing sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi 1 dan 2. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes  $\text{FeCl}_3$  1% pada tabung 1. Hasil positif ditandai dengan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan. Sampel pada tabung 2 ditambahkan beberapa tetes larutan gelatin 2%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih.<sup>11,13,14</sup>

### **Pemeriksaan Saponin**

Larutan ekstrak sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 mL akuades dan dikocok kuat selama 10 menit. Hasil dinyatakan positif apabila buih yang terbentuk stabil selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCL 2N, busa tidak hilang.<sup>13,15</sup>

### **Pemeriksaan Steroida dan Triterpenoid (Uji Liebermann-Burchard)**

Ekstrak sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 1 mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glasial dan 1 mL larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat. Jika warna larutan berubah menjadi biru atau ungu, menandakan

adanya kelompok senyawa steroid, jika warna larutan berubah menjadi merah menunjukkan adanya kelompok senyawa triterpenoid.<sup>10</sup>

### **Pemeriksaan Glikosida**

Ekstrak sampel sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL air dan 5 tetes *Molisch*, ditambahkan dengan hati-hati 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung, terbentuknya cincin ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya gula, dengan demikian menunjukkan adanya glikosida.<sup>13</sup>

### **Pembuatan Variasi Konsentrasi Larutan Uji Ekstak Etanol Biji Pinang**

Ekstrak etanol daun sirsak dibuat dengan konsentrasi 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, dan 1000 mg/mL. Konsentrasi dibuat dengan membuat larutan stok terlebih dahulu. Larutan stok dibuat dengan konsentrasi 1000 mg/mL yaitu menimbang 25 gram ekstrak yang dilarutkan dalam 25 mL DMSO 10%. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak dihitung dengan rumus berikut:<sup>16</sup>

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Keterangan :

$V_1$  =Volume ekstrak etanol daun sirsak yang akan diambil untuk diencerkan.

$V_2$  =Volume ekstrak etanol daun sirsak yang akan dibuat.

$N_1$  =Konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang akan diencerkan.

$N_2$  =Konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang akan dibuat.

### **Identifikasi Bakteri**

Identifikasi bakteri yang dilakukan antara lain dengan pewarnaan Gram, kultur pada medium selektif *Salmonella-Shigella Agar* (SSA), dan uji biokimia yang meliputi uji gula manitol, TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), uji sitrat, uji MIO (*Motility-Indole-Ornithine*), uji urease, uji katalase, dan uji fermentatif-oksidatif.

### **Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

Bakteri uji pada media peremajaan yang berumur 24 jam diambil dengan menggunakan jarum ose dan disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 mL larutan NaCl steril 0,9%. Kekeruhan yang diperoleh kemudian disetarakan dengan Standar Mc. Farland 0,5 dengan bantuan spektrofotometer yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan  $1 \times 10^8$  sel bakteri/mL dan setelah setara maka suspensi ini yang digunakan sebagai bakteri uji.<sup>17</sup>

### **Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Disc Diffusion Kirby-Bauer**

Tahapan awal yang dilakukan yakni kapas ulas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri uji, kemudian diputar beberapa kali dan ditekan ke dinding tabung di atas cairan untuk menghilangkan inokulum yang berlebihan di kapas. Bakteri uji diinokulasikan pada permukaan media agar MHA dengan cara mengulaskan kapas berisi suspensi bakteri tadi ke seluruh permukaan media. Prosedur ini diulangi sebanyak dua kali dengan memutar media agar sekitar 60°. Langkah terakhir adalah mengusap tepi-tepi agar.<sup>17,18</sup>

Kertas cakram berdiameter 6 mm yang steril direndam selama 10-15 menit di dalam ekstrak daun sirsak masing-masing dengan konsentrasi 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, dan 1000 mg/mL. Sebagai kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin 5 µg/disk dan kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 10%. Kertas cakram tersebut kemudian ditempatkan diatas permukaan media sesuai dengan posisi yang ditentukan. Setiap perlakuan dibuat sebanyak 3 kali pengulangan. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam. Selanjutnya diamati zona hambat yang terbentuk dengan melihat zona bening di sekitar cakram yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri.<sup>17</sup>

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi Serbuk Simplisia Daun Sirsak

Ekstraksi serbuk simplisia daun sirsak dilakukan dengan cara maserasi. Serbuk simplisia daun sirsak dimaserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Maserasi dilakukan selama 3 hari dengan penggantian pelarut setiap 1 x 24 jam. Maserasi dilakukan menggunakan wadah kaca yang dilapisi dengan alumunium foil. Pelarut ditambahkan hingga serbuk simplisia terendam semua. Maserasi menggunakan sampel sebanyak 500 gram serbuk simplisia daun sirsak. Selama maserasi dilakukan pengadukan berulang agar kontak antara pelarut dengan bahan lebih optimal sehingga kondisi jenuh yang terlalu cepat dapat dihindari.

Maserat yang didapat kemudian diuapkan dengan *vacum rotary evaporator*. Suhu yang digunakan adalah 58° C karena titik didih etanol adalah 78,5° C dan diharapkan pelarut etanol akan menguap serta senyawa aktif dalam daun sirsak yang sudah tersari tidak rusak oleh suhu yang tinggi. Hasil ekstrak cair yang didapat dari proses evaporasi selanjutnya diuapkan lagi dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 55°C. Ekstrak etanol daun sirsak berwarna coklat, berbau khas konsistensinya kental dan tidak dapat dituang dalam keadaan dingin. Hasil pengujian susut pengeringan diperoleh kadar air ekstrak etanol daun sirsak sebesar 25,872%. Rendemen ekstrak kental daun sirsak yang didapat adalah 25,7298 %.

### Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia telah dilakukan terhadap ekstrak etanol daun sirsak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak positif mengandung alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid yang dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Sirsak

No	Pemeriksaan	Pereaksi	Hasil	Keterangan
1.	Alkaloid	Mayer	-	Tidak terbentuk endapan putih
		Dragendroff	+	Terbentuk endapan orange
		Wagner	+	Terbentuk endapan cokelat
2.	Fenol	Air panas, FeCl <sub>3</sub> 1%	+	Terbentuk warna hijau Kehitaman
3.	Flavonoid	HCl, Mg	+	Terbentuk warna kuning jingga
4.	Saponin	Akuades	+	Terbentuk busa yang stabil setinggi ± 2 cm
5.	Tanin	FeCl <sub>3</sub> 1%	+	Terbentuk warna hitam kehijauan
		Gelatin 2%	+	Terbentuk endapan
6.	Steroid/ Triterpenoid	CH <sub>3</sub> COOH glasial, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	+	Terbentuk cincin berwarna merah (Triterpenoid)
7.	Glikosida	Akuades, Molish, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	-	Tidak terbentuk cincin berwarna ungu

Sumber : Data Primer, 2014

Keterangan : + = Positif, ada kandungan senyawa

- = Negatif, tidak ada kandungan senyawa

### Identifikasi Bakteri Uji

Identifikasi bakteri uji meliputi pewarnaan Gram, kultur pada medium selektif yaitu *Salmonella-Shigella Agar* (SSA) dan uji biokimia yang meliputi uji manitol, TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), MIO (*Motility-Indole-Ornithine*), Simmons sitrat, uji urease, katalase dan fermentatif-oksidatif. Hasil identifikasi bakteri uji dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Bakteri Uji

No	Metode Uji	Hasil	Karakterisasi
1.	Pewarnaan Gram	Bakteri berbentuk batang dan berwarna merah	+
2.	Kultur pada media SSA	Koloni bakteri tidak berwarna ( <i>colourless</i> ), tanpa H <sub>2</sub> S (bulatan hitam), dan tanpa gas	+
3.	Uji gula manitol	Bakteri memfermentasikan manitol	+
4.	Uji TSIA	Lereng alkalis (merah) , dasar asam (kuning) atau K/A, H <sub>2</sub> S (-), Gas (-)	+
5.	Uji Sitrat	Aktivitas Simmons sitrat negatif	+
6.	Uji pada media MIO	Nonmotil, aktivitas Indol negative, dan tidak dapat mendekarboksilasi ornitin	+
7.	Uji urease	Aktivitas urease negatif	+
8.	Uji fermentatif-okisidatif	Fermentatif	+
9.	Uji Katalase	Aktivitas katalase positif ditandai dengan pembentukan gelembung udara	+

Sumber : Data Primer, 2014

Keterangan : (+) = Sesuai dengan karakteristik *Shigella flexneri*  
 (-) = Tidak sesuai dengan karakteristik *Shigella flexneri*

Hasil identifikasi dengan pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri uji merupakan bakteri Gram negatif. Pada pewarnaan gram bakteri terlihat berwarna merah dan berbentuk batang. Hasil identifikasi menggunakan media selektif *Salmonell-Shigella Agar* (SSA) menunjukkan koloni yang tidak berwarna (*colourless*) karena *Shigella flexneri* tidak dapat memfermentasikan laktosa. Gambaran hasil pewarnaan gram dan pertumbuhan *Shigella flexneri* pada media SSA dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.

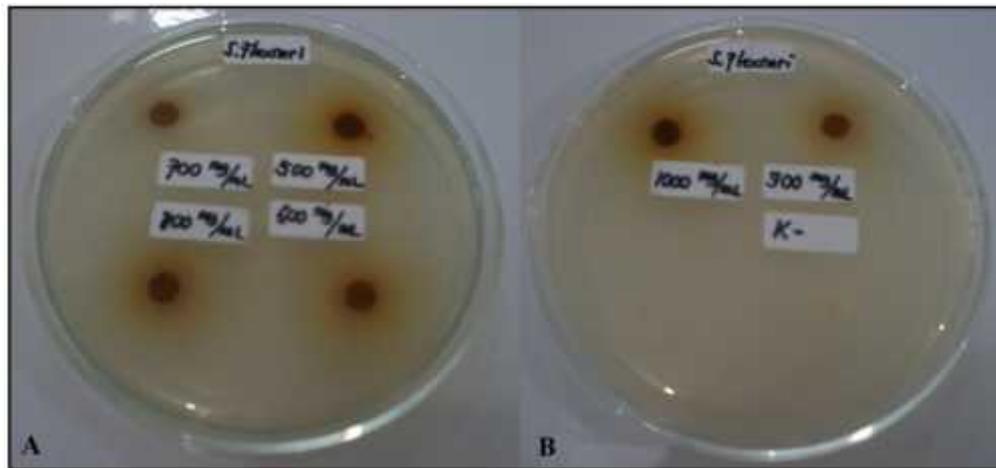


Gambar 1. Hasil pewarnaan Gram *Shigella flexneri* (Perbesaran 100x10)

Gambar 2. Pertumbuhan *Shigella flexneri* pada SSA

### Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Disc Diffusion Kirby-Bauer

Uji aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menggunakan kontrol negatif (DMSO %), kontrol positif (siprofloksasin 5 µg/disk), dan variasi konsentrasi larutan uji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontrol negatif tidak memberikan zona hambat. Hal ini berarti DMSO merupakan pelarut ekstrak yang baik karena dapat melarutkan tanpa memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri uji, sehingga respon kematian bakteri benar-benar berasal dari larutan uji yang digunakan.<sup>19</sup> Kontrol positif siprofloksasin memberikan hasil daerah hambat sebesar 31,56 mm. Hal ini menunjukkan bahwa siprofloksasin masih sensitif terhadap *Shigella flexneri*. Hasil ini diinterpretasikan berdasarkan tabel interpretasi zona hambat antibiotik. Siprofloksasin dikatakan sensitif jika zona hambat yang dihasilkan 21 mm, intermediet 16-20 mm, dan resisten 15 mm.<sup>18</sup> Hasil pengamatan terhadap aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak dengan variasi konsentrasi 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL, 900 mg/mL, dan 1000 mg/mL terhadap *Shigella flexneri* setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan menunjukkan tidak adanya zona hambat atau zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari variasi konsentrasi ini dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil pengamatan 1×24 jam ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi 500 mg/mL, 600 mg/mL, 700 mg/mL, 800 mg/mL (A); 900 mg/mL, dan 1000 mg/mL (B) (Data Primer, 2014)

Tabel 3. Hasil Uji aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirsak

No	Konsentrasi (mg/mL)	Diameter zona hambat (mm)			Rata-rata (mm)
		Pengulangan			
		I	II	III	
1.	500	0	0	0	0
2.	600	0	0	0	0
3.	700	0	0	0	0
4.	800	0	0	0	0
5.	900	0	0	0	0
6.	1000	0	0	0	0

Sumber : Data Primer, 2014

Keterangan : 0 = tidak ada zona hambat

Aktivitas antibakteri dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yang dibagi menjadi faktor biologis dan faktor teknis. Faktor teknis sebagian besar dapat dikendalikan oleh peneliti namun faktor biologis tidak dapat dikendalikan oleh peneliti.<sup>18</sup> Brooks *et al.* (2008) juga menyatakan bahwa aktivitas antibakteri dipengaruhi beberapa faktor yaitu konsentrasi ekstrak, kandungan senyawa antibakteri, daya difusi ekstrak, dan jenis bakteri yang dihambat.<sup>20</sup>

Hasil pemeriksaan skrining fitokimia ekstrak etanol daun sirsak menunjukkan bahwa daun sirsak mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Berbagai hasil studi literatur menyatakan bahwa senyawa metabolit sekunder tersebut memiliki mekanisme kerja sebagai antibakteri. Namun, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak tidak mampu menghambat pertumbuhan *Shigella flexneri*. Hal ini diduga karena dari semua senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun sirsak, belum diketahui jenis senyawa mana yang paling bertanggung jawab sebagai antibakteri, sehingga belum dapat diketahui sifat kimianya. Sifat kimia tersebut sangat menentukan jenis pelarut dan cara isolasi yang terbaik untuk mendapatkan senyawa aktif yang terkandung dalam daun sirsak. Haro *et al.* (2012) melaporkan bahwa diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri ekstrak metanol daun sirsak jauh lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol.<sup>21</sup> Hal ini disebabkan karena metanol lebih baik dibandingkan etanol dalam menarik senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun sirsak. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa ekstrak metanol daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri Gram positif dan Gram negatif.<sup>6,22</sup>

Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan cara merusak dinding sel melalui komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri.<sup>23</sup> Untuk dapat merusak lapisan peptidoglikan tersebut, senyawa alkaloid harus mampu menembus membran luar *Shigella flexneri*. Membran luar *Shigella flexneri* mengandung lipopolisakarida (LPS) yang terdiri atas lipid A yang impermeabel terhadap senyawa eksogen.<sup>24</sup> More *et al.* (2012) melaporkan bahwa fraksi alkaloid terisolasi tidak dapat melawan bakteri gram negatif. Hal ini disebabkan karena membran luar bakteri gram negatif memiliki barrier penetrasi berbagai molekul antibakteri dan ruang periplasma mengandung enzim yang mampu mendegradasi molekul eksogen.<sup>25</sup>

Senyawa fenol memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mendenaturasi protein dan mengganggu fungsi membran sel, sehingga sel

menjadi lisis.<sup>20</sup> Flavonoid merupakan turunan dari senyawa fenol dan bersifat sebagai koagulator protein.<sup>23</sup> Toksisitas senyawa fenol terhadap bakteri tergantung pada jumlah gugus hidroksil dan konsentrasi yang diberikan.<sup>26</sup> Fenol berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak.<sup>27</sup> Fenol mampu menyebabkan koagulasi protein sel dan melisiskan sel pada kadar yang tinggi, sedangkan pada konsentrasi rendah terbentuk kompleks protein-fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian sehingga efek antibakterinya menjadi lemah.<sup>7</sup>

Tanin juga merupakan turunan senyawa fenol. Tanin memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi materi genetik.<sup>23</sup> Sifat antibakteri tanin tergantung pada struktur kimia dan berat molekul.<sup>28</sup> Tanin dengan berat molekul rendah memiliki aktivitas yang lebih baik daripada tanin dengan berat molekul yang lebih besar.<sup>29</sup> Tanin dapat diklasifikasikan ke dalam tanin kondensasi dan tanin hidrolisis. Penelitian yang dilakukan oleh Lim *et al.* (2006), menunjukkan bahwa hanya tanin hidrolisis yang menunjukkan aktivitas antibakteri, tanin hidrolisis ditemukan memiliki aktivitas antibakteri yang jauh lebih baik dibandingkan tanin kondensasi atau campuran dari keduanya.<sup>30</sup>

Saponin adalah sejenis senyawa glikon yang memiliki struktur kimia inti yang larut dalam lemak (aglikon).<sup>31</sup> Secara umum mekanisme saponin yaitu dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga dapat mengubah struktur dan fungsi membran, menyebabkan denaturasi protein yang mengakibatkan membran sel akan rusak atau lisis.<sup>23</sup> Mekanisme ini tergantung dari konsentrasi saponin yang diberikan dan jumlah gugus gula pada aglikon. Saponin dengan konsentrasi tinggi mampu melisiskan membran sel, sementara saponin dengan konsentrasi rendah hanya mampu berinteraksi dengan membran sel tetapi tidak sampai melisiskan sel. Aktivitas antibakteri dari saponin dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jenis rantai aglikonnya, jumlah, posisi dan struktur

kimia dari gugus gulanya. Semakin banyak gugus gulanya, maka semakin lemah efek antibakterinya.<sup>31</sup>

Terpenoid yang bersifat lipofilik memiliki aktivitas antibakteri dengan cara merusak membran sel bakteri, senyawa ini akan bereaksi dengan sisi aktif membran, melarutkan konstituen lipid dan meningkatkan permeabilitasnya.<sup>32</sup> Unsur penting yang berperan dalam aktivitas antibakteri terpenoid berhubungan dengan komposisi kimianya yang meliputi gugus fungsi dan gugus hidroksil dari terpenoid fenolik serta jumlah komponen tunggal. Uji in vitro terdahulu menunjukkan bahwa terpenoid yang digunakan sebagai senyawa tunggal kurang efektif sebagai antibakteri. Selain itu, aktivitas antibakteri terpenoid juga tergantung pada jumlah senyawa yang dihasilkan. Pada konsentrasi rendah, terpenoid hanya mempengaruhi enzim yang terlibat dalam produksi energi sedangkan pada konsentrasi tinggi terpenoid dapat melisis membran.<sup>24</sup> Tidak semua senyawa terpen memiliki aktivitas antibakteri, sejauh ini senyawa terpenoid yang paling aktif yaitu golongan monoterpenoid (*carvacrol* dan *thymol*).<sup>34</sup>

Ketahanan suatu bakteri terhadap senyawa antibakteri berkaitan erat dengan struktur dinding selnya. Hasan *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa senyawa aktif yang berasal dari tanaman sering menunjukkan aktivitas yang lebih baik terhadap bakteri gram positif tetapi tidak terhadap bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki *barrier* permeabilitas yang efektif. Adanya *barrier* permeabilitas inilah yang kemungkinan besar menyebabkan aktivitas antibakteri dari senyawa aktif ekstrak daun sirsak menjadi tidak efektif.<sup>33</sup>

*Shigella flexneri* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks yang terdiri atas beberapa komponen yaitu lipopolisakarida yang berperan sebagai penghalang masuknya bahan bioaktif antibakteri, membran luar yang mengandung molekul protein yang disebut porin, lipoprotein, dan lapisan dalam berupa lapisan peptidoglikan yang tipis dan fosfolipid (11-22%).<sup>20</sup> Porin yang

terdapat pada membran luar *Shigella flexneri* merupakan *barrier* selektif untuk zat terlarut hidrofilik dengan batas minimal zat dengan berat molekul 600 dalton. Namun untuk molekul-molekul komponen ekstrak daun sirsak yang besar relatif lambat dalam menembus membran luar sehingga lebih sukar masuk ke dalam sel bakteri.<sup>20,35</sup> Selain itu, *Shigella flexneri* memiliki struktur antigenik yang kompleks yaitu antigen O yang berperan dalam resistensi aktivitas zat antibakteri. Antigen O merupakan bagian terluar dari lipopolisakarida dinding sel dan terdiri dari unit polisakarida yang berulang. Antigen O memiliki sifat yang tahan terhadap panas dan alkohol, sehingga hal ini memungkinkan bakteri *Shigella flexneri* lebih tahan terhadap senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun sirsak.<sup>20</sup>

Selain beberapa hal di atas, perlu diperhatikan pula adanya resistensi antibiotik pada *Shigella flexneri*. Penelitian Agtini *et al.* (2005) dan Herwana *et al.* (2010) melaporkan bahwa *Shigella flexneri* telah mengalami resistensi terhadap beberapa antibiotik seperti kloramfenikol, seftriakson, ampisilin, tetrasiklin, dan trimetoprim-sulfametoksazol.<sup>2,4</sup> Antibiotik tersebut bekerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel, menghambat fungsi membran, dan sintesis protein bakteri yang mana cara kerja dari kelima antibiotik ini hampir sama dengan cara kerja sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak daun sirsak. Resistensi antibiotik pada bakteri enterik sebagian besar disebabkan oleh penyebaran resistensi plasmid yang paling banyak terdapat dalam bakteri gram negatif. Adanya resistensi ini dapat mengurangi daya bunuh dan efektivitas antibakteri.<sup>3,20</sup>

## KESIMPULAN DAN SARAN

Ekstrak etanol 70% daun sirsak tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella flexneri*. Masih perlu dilakukan penelitian lanjutan menggunakan pelarut selain etanol 70% seperti metanol, *n*-heksana, etil asetat dan kloroform terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif lainnya. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk uji antibakteri menggunakan bagian tanaman sirsak lainnya seperti kulit buah, kulit batang, dan biji sirsak.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Menteri Kesehatan Republik Indonesia, 2009, Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 261/MENKES/SK/IV/2009 Tentang Farmakope Herbal Indonesia Edisi Pertama.
2. Agtini, M.D; Lesmana M; Punjabi NH; Simanjuntak S; Soeharno R; Wangsaputra F *et al.*, 2005, The Burden of Diarrhoea, Shigellosis dan Cholera in North Jakarta, Indonesia: findings from 24 Month Surveillance, *BMC Infectious Diseases*, 5 (89): 1-11.
3. Nafianti, S dan Sinuhaji A. B., 2005, Resistensi Trimetoprim-Sulfametoksazol terhadap Shigellosis, *Sari Pediatri*, 7 (1): 39-44.
4. Herwana, E; Indriani, N; Lesmana, M; Paul, B; Salim, O.C; Surjawidjaja, J.E; 2010, *Shigella*-Associated Diarrhea in Children in South Jakarta, Indonesia, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2 (41): 418-25.
5. Wicaksono, Adi, 2011, Kalahkan Kanker dengan Sirsak, Citra Media Mandiri, Yogyakarta.
6. Pathak, P; Saraswathy; Vora, A; Savai, J; 2010, In Vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of The Leaves of *Annona muricata*, *International Journal of Pharma, Research and Development (IJPRD)*, 5(2): 1-6.
7. Sari, Y. D; Djannah, S. N; Nurani, L. H; 2010, Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) secara In Vitro Terhadap *staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya, *Jurnal KES MAS UAD*, 3 (4):144 – 239.
8. Poedjiadi, A., 2005, Dasar-dasar Biokimia, Universitas Indonesia, Jakarta.
9. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986, Sediaan Galenik, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
10. Harborne, J. B, 1987, Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Penerbit ITB, Bandung.

11. Sangi, M; Runtuwene, M.R.J; Simbala, H.E.I; Makang, V.M.A; 2008, Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara, *Chem. Prog.*, 1(1):47-53.
12. Harborne, J. B, 2006, Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Penerbit ITB, Bandung.
13. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, Farmakope Indonesia Ed IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
14. 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.
15. Gupta, C; Garg, A; Gupta, S; 2010, Antimicrobial And Phytochemical Studies Of Fresh Ripe Pulp And Dried Unripe Pulp Of *Mangifera Indica* (Amchur), *Middle-East Journal Of Scientific Research*, 5(2): 75-80.
16. Permatasari, G. A. A. A; Besung, I. N. K; Mahatmi, H; 2013, Daya Hambat Perasan Daun Sirsak Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*, *Indonesia Medicus Veterinus*, 2(2); 162-9.
17. ICMR, 2009, Detection of Antimicrobial Resistance in Common Gram Negative and Gram Positive Bacteria Encountered in Infectious Diseases-An Update, *ICMR Bulletin*, 9(1-3).
18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard Eleventh Edition, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 32 (1).
19. Hatijah, S; Husain, D. R; Sartini, 2013, Bioaktivitas Minyak Atsiri Umbi Lapis Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Lokal Asal Bima terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* Penyebab Karies Gigi, Universitas Hasanudin, Fakultas Farmasi, (Naskah Publikasi).
20. Brooks, Geo F; Butel, Janet S; Morse, Stephen A., 2008, Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg, EGC, Jakarta.
21. Haro, G; Utami, N.P; Sitompul, E; 2014, Study Of The Antibacterial Activities Of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves, *International Journal of PharmTech Research*, 6(2): 578-81.
22. Rusmiyati, I; Husain, D.R; Alam, G; 2013, Bioaktivitas Ekstrak Metanol Daun Muda Sirsak (*Annona muricata* L.) Sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar (Naskah Publikasi).
23. Juliantina, R. F; Citra, M. D. A; Nirwani, B; Nurmasitoh, T; Bowo, E. T; 2009, Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif, *Jurnal Kedokteran dan kesehatan Indonesia*.
24. Nazzaro, F; Fratianni, F; Martino, L. D; Coppola, R; Feo, V. D; 2013, Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria, *Pharmaceuticals*, 6:1451-74.

25. More, S; Maldar, N. N; Bhamra, P; Sharon, M; Sharon, M; 2012, Antimicrobial activity of Naphthyl Iso-quinoline alkaloids of *Ancistrocladus heyneanus*: I Extracted from Leaves, *Pelagia Research Library*, 3(5): 2760-5.
26. Cowan, Marjorie M., 1999, Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-82.
27. Susanti, A, 2008, Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica less*) terhadap *Escherichia coli* Secara In Vitro, *Jurnal Universitas Airlangga*, 1 (1).
28. Al Ani, R.T; Mohammed, N; Alhameed, A; Mohammed, S; 2008, Antibacterial Activity of Tannins Extracted from Some Medicinal Plants in vitro, Department of Biochemistry, Al-Anbar University, Iraq.
29. Costabile, A; Sanghi, S; Pelaez, S.M; Harvey, I.M; Gibson, G.R; Rastal, R.A *et al.*, 2011, Inhibition of Salmonella Typhimurium by tannins in vitro, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(1): 119-24.
30. Lim, S.H; Darah, I; Jain, K; 2006, Antimicrobial Activities Of Tannins Extracted From *Rhizophora Apiculata* Barks, *Journal of Tropical Forest Science* 18(1): 59—65.
31. Hassan, Sherif Mohamed, 2008, Antimicrobial Activities Of Saponin-Rich Guar Meal Extract, Poultry Science, A&M University, Texas, (Disertasi).
32. Mayanti, T; Julaeha, E; Putri, Y; 2011, Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang *Lansium Domesticum* Corr. Cv Kokossan, Universitas Padjajaran, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Bandung, (Naskah Publikasi).
33. Hasan, N.A; Nawahwi, M.Z; Malek,H.A; 2013, Antimicrobial Activity of *Nigella sativa* Seed Extract, *Sains Malaysiana* 42(2):143–7.
34. Hildgaard, M; Mygind, T; Meyer, R.L; 2012, Essential Oils In Food Preservation: Modeofaction, Synergies, And Interactions With Food Matrix Components, *Frontiers in Microbiology*, 3(12):1-24.
35. Arias, M. E; Gomez, J.D; Cudmani, N. M; Vattuone, M. A; Isla, M. I; 2004, Antibacterial Activity Of Ethanolic And Aqueous Extracts Ofacacia Aroma Gill. Ex Hook Et Arn, *Life Sciences*, 75: 191–202.