

SKRINING FITOKIMIA TANAMAN KROKOT (*Portulaca oleracea*) DAN UJI DAYA HAMBAT TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*

**Silvia Nurul Istikhomah, Akademi Farmasi Surabaya
Surahmaida, Akademi Farmasi Surabaya
Prasetyo Handrianto, Akademi Farmasi Surabaya**

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan senyawa kimia tanaman Krokot (*Portulaca oleracea*) menggunakan skrining fitokimia dan uji daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang tanaman Krokot yang diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dan pelarut metanol sebagai pelarutnya. Ekstrak metanol daun dan batang Krokot kemudian diuji dengan skrining fitokimia untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan saponin. Setelah itu, dilanjutkan dengan menguji daya hambat ekstrak metanol daun dan batang tanaman Krokot menggunakan metode kertas cakram dengan 6 kali pengulangan. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun dan batang krokot mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin yang memiliki efek menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hasil uji daya hambat bakteri menunjukkan pada konsentrasi 100% ekstrak metanol daun dan batang krokot merupakan konsentrasi yang optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* yang ditunjukkan dengan zona hambat sebesar 3,33 mm. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun dan batang krokot dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*.

Keyword: Krokot (*Portulaca oleracea*), maserasi, metanol, zona hambat, antibakteri, *Escherichia coli*.

PHYTOCHEMICAL SCREENING OF KROKOT PLANTS (*Portulaca oleracea*) and INHIBITORY TEST AGAINST *Escherichia coli* BACTERIA

This study was conducted to determine the chemical compound of *Portulaca oleracea* plants using phytochemical screening and its potential of *Portulaca oleracea* plants as antibacterial *Escherichia coli*. The sample that was used in this study was the leaves and stems of *Portulaca oleracea* plants which were extracted by maceration method using methanol as solvent. The methanol extract of leaves and stems of *Portulaca oleracea* were then tested with phytochemical screening to identify the alkaloid, flavonoid, tannin and saponin compounds. After that, it was continued by testing the inhibition of methanol extract of leaves and stems *Portulaca oleracea* plants using paper disc method with 6 replication. The result of the phytochemical test showed that leaf and stem extract contains flavonoid, alkaloids, tannins, and saponins. The result of antibacterial inhibition test showed that the concentration of 100% was the optimal concentration of methanol extract of *Portulaca oleracea* plants obtained inhibit zone of 3,33 mm. It was concluded that the extract of methanol leaves and stems of purslane plants can inhibit the growth of *Escherichia coli* bacteria.

Keyword : Krokot (*Portulaca oleracea*), maseration, methanol, inhibition zone, antibacterial, *Escherichia coli*.

PENDAHULUAN

Penyakit dapat timbul dengan beberapa penyebab, salah satunya adalah mikroba patogen seperti bakteri, virus, jamur dan lain-lain. Penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen ini disebut penyakit infeksi (Darmadi, 2008). Infeksi dapat menyebabkan timbulnya diare dan muntah-muntah, yang berakibat gangguan absorpsi asupan makanan dan berdampak pada gangguan proses metabolisme (Ryadi, 2016).

Diare merupakan kondisi dimana seseorang buang air besar lebih sering dari kesehariannya (tiga kali atau lebih dalam sehari) dengan mengeluarkan tinja yang lebih encer atau cair dibandingkan dengan biasanya (Ekawati, 2014). Diare dapat disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* (Misnadiarly, 2014). *Escherichia coli*

merupakan bakteri *facultatively anaerobic gram-negative* berbentuk batang yang termasuk dalam familia *Enterobacteriaceae* (Arisman, 2009). Diare dapat diobati dengan menggunakan tanaman obat atau dengan cara pengobatan tradisional.

Tanaman obat terbukti efektif menyembuhkan penyakit dan tidak menimbulkan efek samping (Hembing, 2008). Hal inilah yang menyebabkan masyarakat kembali menggunakan bahan alam sebagai alternatif pengobatan. Krokot (*Portulaca oleracea* L) merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat keluarga, seperti hepatitis, keputihan, disentri, radang usus buntu, diare akut, wasir berdarah, radang payudara (Fajriyah, 2017). Krokot mengandung senyawa kimia yang bermanfaat seperti tannin, saponin, vit (A, B, dan C), 1-nonadrenalin, noradrenalin, dopamine, dopa, KCL, K₂, K₂SO₄, KNO₃, dan *nicotin acid* (AgroMedia, 2008). Dari penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Chrystie Yudha, dkk (2013), menunjukkan bahwa krokot dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional, untuk mengobati penyakit kulit dan diare.

Dari latar belakang tersebut di atas, maka peneliti ingin mengetahui potensi dan pengaruh ekstrak daun dan batang tanaman krokot, serta uji daya hambatnya terhadap bakteri *Escherichia coli*.

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu autoklaf, batang L, blender, freezer, gelas beker, gelas ukur, *hot plate*, inkubator, kamera, elenmeyer, kawat ose, bunzen, oven, cawan petri, tabung reaksi, timbangan digital, *magic stirrer*, mikropipet, toples kaca, pengaduk kaca, kertas saring, *paper disc* (kertas cakram), jangka sorong, pinset, *aluminium foil*, *cotton bud*, kapas penyumbat, spidol, kaca arloji, sendok tanduk.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu daun dan batang krokot, pelarut metanol, aquadest, *Nutrien Agar*, *NaCl*.

Persiapan Sampel yaitu sebagai berikut ekstraksi daun dan batang krokot menggunakan metode maserasi, dengan menggunakan pelarut metanol. Proses ekstraksi dilakukan sebagai berikut.

- a. Daun dan batang krokot dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian diangin-anginkan hingga kering. Daun dan batang yang telah kering dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk halus.
- b. Ditimbang masing-masing daun dan batang krokot sebanyak 10 gram kemudian masukkan kedalam toples kaca.
- c. Rendam dengan pelarut metanol sebanyak 100 ml atau sampai terendam seluruhnya, tutup menggunakan *aluminium foil* dan biarkan selama 5 hari sambil diaduk sesekali setiap hari, lalu saring menggunakan kertas saring.
- d. Kemudian dilakukan remaserasi dengan metanol sebanyak 100 ml, tutup menggunakan *aluminium foil* dan biarkan selama 3 hari sambil diaduk sesekali setiap hari, setelah 3 hari sampel tersebut disaring menggunakan kertas saring sehingga menghasilkan filtrat.

Identifikasi tanaman yaitu menganalisa kandungan senyawa metabolit sekunder dalam tanaman krokot.

- a. Identifikasi Flavonoid (Harborne, 1987).
Larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambah dengan sedikit serbuk magnesium dan 2 ml HCl 2N. Adanya senyawa flavonoid akan menimbulkan warna jingga sampai merah.
- b. Identifikasi Alkaloid (Harborne, 1987).
 - 1) Uji Wagner (Harborne, 1987).
Larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambahkan 2 tetes pereaksi wagner. Adanya senyawa alkaloid akan menimbulkan endapan coklat.
 - 2) Uji Dragendorf (Harborne, 1987).
Larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendrof. Adanya senyawa alkaloida akan menimbulkan endapan merah hingga jingga.
- c. Identifikasi Tanin (Robinson, 1991)
Larutan uji sebanyak 1 ml direaksikan dengan larutan besi (III) klorida 10%, jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin.
- d. Identifikasi Saponin (Harborne, 1987).
Larutan ekstrak sebanyak 2 ml ditambah aquadest kemudia dikocok kuat-kuat. Adanya senyawa saponin akan menghasilkan busa setinggi 1-10 cm.

Pembuatan Larutan Uji

Dibuat larutan uji secara berturut-turut dengan konsentrasi yang berbeda.

- a Konsentrasi 70 % = 7 mL ekstrak krokot ditambah aquades sampai 10 mL, masukkan kedalam labu ukur kesatu.
- b Konsentrasi 80 % = 8 mL ekstrak krokot ditambah aquades sampai 10 mL, masukkan kedalam labu ukur kedua.
- c Konsentrasi 90 % = 9 mL ekstrak krokot ditambah aquades sampai 10 mL, masukkan kedalam labu ukur ketiga.
- d Konsentrasi 100 % = 10 mL ekstrak krokot masukkan kedalam labu ukur keempat.

Setelah larutan divortex dibiarkan selama 30 menit kemudian dituangkan dalam cawan petri yang telah diberi kertas cakram steril, rendam selama 10 menit lalu pindahkan kertas cakram dalam cawan petri steril sesuai variabel konsentrasi masing-masing (Capuccino and Sherman, 2001). Perlakuan yang sama juga dilakukan untuk ekstrak batang krokot.

Pembuatan Media

Suspensi bakteri uji : Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan NaCl 0,9%, tutup tabung reaksi dengan kapas dan *aluminium foil* . Homogenkan dengan *vortex mixer* selama 1 menit, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Media dasar NA

- 1 *Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 2,8 g, kemudian dilarutkan dengan aquadest kedalam elenmeyer sebanyak 100 ml.
- 2 Media dihomogenkan dengan *stirrer* diatas penangas air sampai mendidih atau hingga berwarna seperti minyak goreng.
- 3 Elenmeyer ditutup kapas dan dibungkus dengan *aluminium foil*, kemudian disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media pengujian

- 1 Media *Nutrient Agar* dituangkan pada cawan petri, masing-masing sebanyak 15 ml lakukan secara aseptis dan dibiarkan hingga dingin dan padat.

- 2 Kemudian ditambahkan 0,1 ml bakteri *Escherichia coli* aktif. Diratakan dengan *spreader* sampai mengering.
- 3 Kemudian kertas cakram direndam pada masing-masing perlakuan konsentrasi ekstrak daun dan batang krokot selama 10 menit.
- 4 Kertas cakram yang sudah direndam diletakkan pada permukaan media *Nutrient Agar*.
- 5 Cawan petri dibungkus menggunakan plastik wrap kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Pengamatan Zona Hambat dilakukan setelah 24 jam, masa inkubasi dengan 6 kali pengulangan untuk masing-masing konsentrasi. Diamati zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram kemudian diukur diameter zona hambat dalam satuan millimeter (mm) menggunakan jangka sorong.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Uji skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya golongan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin. Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 1.1.

Tabel 1.1 Hasil Uji Skrining Fitokimia Batang dan Daun Ekstrak Krokot

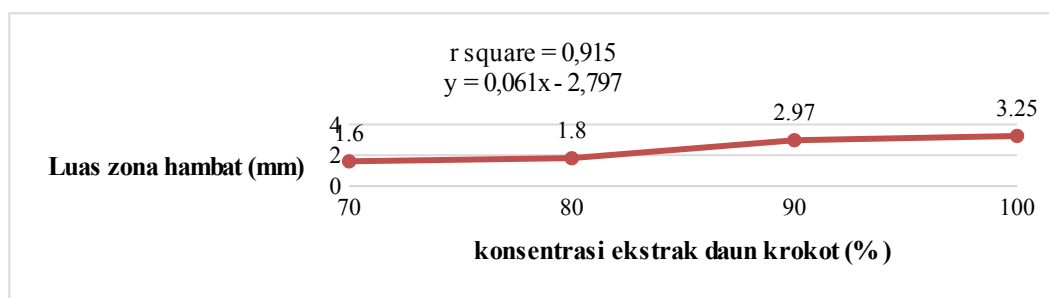
No	Skrining Fitokimia	Herba Krokot	
		Daun	Batang
1.	Flavonoid	+	+
2.	Alkaloid	+	+
3.	Tannin	+	+
4.	Saponin	+	+

Hasil penelitian mengenai uji daya hambat antibakteri ekstrak daun dan batang krokot (*Portulaca oleracea* L) menggunakan pelarut metanol terhadap zona hambat bakteri *Escherichia coli*, dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak batang dan daun krokot dengan menggunakan metode difusi kertas cakram pada konsentrasi setiap sampel adalah 70%, 80%, 90%, 100% terhadap zona hambat bakteri *Escherichia coli* yang terbentuk setelah diinkubasi selama 24 jam dengan melakukan pengulangan 6 kali. Data dapat disajikan dalam bentuk tabel sebagai berikut.

Replikasi	Kontrol Negatif	Luas Diameter Zona Hambat			
		70%	80%	90%	100%
1	-	1,10	1,10	2,10	3,10
2	-	1,10	2,10	2,60	2,20
3	-	2,10	1,10	3,20	3,40
4	-	2,40	2,70	2,30	3,30
5	-	1,20	2,40	3,70	3,80
6	-	1,70	1,40	3,60	3,70
Rata-rata (mm)	-	1,60	1,80	2,97	3,25
Kategori	-	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah

Tabel 1.2 Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Krokot (*Portulaca oleracea* L) terhadap bakteri *Escherichia coli*

Berdasarkan hasil dari keenam pengulangan efektifitas daya hambat larutan ekstrak daun krokot diperoleh hasil bahwa pada konsentrasi 90% mulai menunjukkan adanya zona hambat yang signifikan yaitu sebesar 2,97 mm dan pada konsentrasi 100% menghasilkan zona hambat sebesar 3,25 mm lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dibandingkan pada konsentrasi 70 % yang menghasilkan zona hambat sebesar 1,60 mm dan pada konsentrasi 80% sebesar 1,80 mm, namun daya hambat yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi masih dikategorikan respon daya hambat lemah (Davis and Stout, 1971).



Gambar 1.1 Kurva rata-rata Antibakteri Ekstrak Daun Krokot (*Portulaca oleracea*) Terhadap bakteri *Escherichia coli*

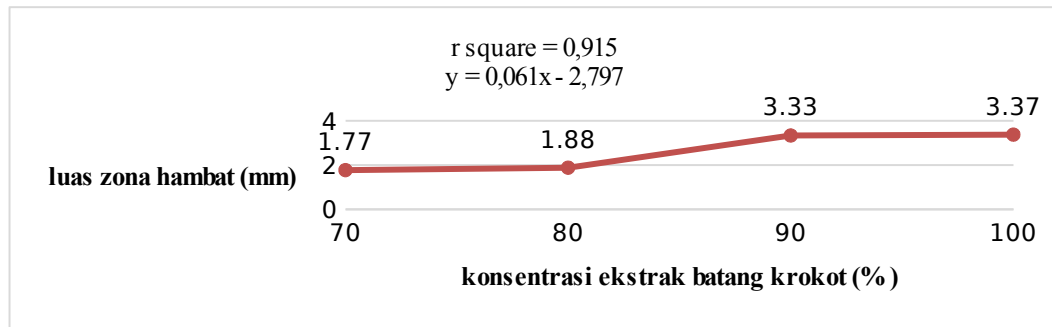
Berdasarkan grafik kurva rata-rata pada gambar 2.3 diketahui konsentrasi yang paling signifikan dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* yaitu pada konsentrasi 100% yang menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 3,25 mm dengan kategori lemah. Dan hasil korelasi nilai r yang diperoleh adalah $r = 0,915$. Dimana kriteria koefisien korelasi $0,90 < |r| \leq 1,00$ yaitu termasuk dalam kriteria keeratan hubungan yang sangat kuat atau sangat tinggi (Hasan, 2006). Dapat disimpulkan bahwa nilai y (zona hambat) terdapat hubungan yang sangat kuat terhadap nilai x (konsentrasi). Untuk mengetahui tingkat signifikan dari konsentrasi ekstrak daun krokot terhadap bakteri *Escherichia coli*. Maka dilakukan analisis data menggunakan uji Anova One Way dengan menggunakan SPSS 16 dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Tabel 1.3 Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Batang Krokot (*Portulaca oleracea*) terhadap bakteri *Escherichia coli*

Replikasi	Kontrol Negatif	Luas Diameter Zona Hambat			
		70%	80%	90%	100%
1	-	1,10	2,70	4,10	4,20
2	-	2,10	1,10	3,10	3,90
3	-	2,20	2,40	3,90	3,60
4	-	1,40	1,30	2,80	2,60
5	-	1,70	1,60	2,70	2,60
6	-	2,10	2,20	3,40	3,30
Rata-rata (mm)	-	1,77	1,88	3,33	3,37
Kategori	-	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah

Berdasarkan hasil dari keenam pengulangan efektifitas daya hambat larutan ekstrak batang krokot diperoleh hasil bahwa pada konsentrasi 90% mulai menunjukkan adanya zona hambat yang signifikan yaitu sebesar 3,33 mm dan pada konsentrasi 100% menghasilkan zona hambat sebesar 3,37 mm lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dibandingkan pada konsentrasi 70 % yang menghasilkan zona hambat sebesar 1,77 mm dan pada konsentrasi 80% sebesar 1,88 mm, namun daya hambat yang dihasilkan dari

masing-masing konsentrasi masih dikategorikan respon daya hambat lemah (Davis and Stout, 1971).



Gambar 1.2 Kurva rata-rata Antibakteri Ekstrak Daun Krokot (*Portulaca oleracea*) Terhadap bakteri *Escherichia coli*

Berdasarkan grafik kurva rata-rata pada gambar 2.3 diketahui konsentrasi yang paling signifikan dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* yaitu pada konsentrasi 100% yang menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 3,37 mm dengan kategori lemah. Dan hasil korelasi nilai r yang diperoleh adalah $r = 0,915$. Dimana kriteria koefisien korelasi $0,90 < |r| \leq 1,00$ yaitu termasuk dalam kriteria keeratan hubungan yang sangat kuat atau sangat tinggi (Hasan, 2006). Dapat disimpulkan bahwa nilai y (zona hambat) terdapat hubungan yang sangat kuat terhadap nilai x (konsentrasi). Untuk mengetahui tingkat signifikan dari konsentrasi ekstrak daun krokot terhadap bakteri *Escherichia coli*. Maka dilakukan analisis data menggunakan uji Anova One Way dengan menggunakan SPSS 16 dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil penelitian uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak krokot mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, saponin dan tannin. Hal ini ditandai dengan adanya warna jingga sampai merah pada ekstrak uji yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa fenolik yang dapat membunuh sel bakteri dengan cara mengubah protein dan merusak semipermeabilitas membrane sel, sehingga sel menjadi permeabel dan mengakibatkan plasmolisis. Kemudian keluarnya cairan sitoplasma bersama bahan penting lainnya dapat mengakibatkan kematian mikroba (Harborne, 1987; Sunartyo, 2000). Adanya endapan coklat pada uji wagner dan adanya endapan merah jingga pada uji dragendroff pada ekstrak uji yang menunjukkan adanya

senyawa alkaloid. Mekanisme kerja alkaloid sebagai anti bakteri yaitu dengan cara merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak dapat terbentuk sempurna dan menyebabkan kematian sel tersebut (Juliantina, 2008).

Adanya warna biru tua atau hitam kehijauan pada ekstrak uji yang menunjukkan adanya senyawa tannin, mekanisme kerja tannin sebagai anti bakteri yaitu dengan cara mengendapkan protein dan dapat merusak membran sel sehingga pertumbuhan jamur terhambat (Sudira et al., 2011). Tannin merupakan senyawa yang bersifat lipofilik sehingga mudah terikat pada dinding sel dan mengakibatkan kerusakan dinding sel (Sudira et al., 2011). Senyawa metabolit inilah yang berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Dan adanya busa setinggi 1-10 cm selama 10 menit pada sampel ekstrak uji menunjukkan adanya senyawa saponin (Latifah, 2008). Saponin akan mengganggu tegangan permukaan dinding sel, sehingga dinding sel akan pecah atau lisis (Pratiwi, 2008).

Bakteri *Escherichia coli* merupakan gram negatif yang memiliki lapisan dinding sel yang dilapisi oleh membran luar yang terdapat protein, fosfolipid, dan lipopolisakarida dan ruang periplasmik (Ibrahim, 2007). Sehingga pada media yang ditumbuhi bakteri *Escherichia coli* terbentuk zona hambat yang relatif kecil. Pada umumnya, diameter zona hambat cenderung meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Tetapi ada penurunan luas zona hambat pada beberapa konsentrasi yang lebih besar, kemungkinan ini terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar serta jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda pada lama waktu yang tertentu (Elifah, 2010).

SIMPULAN

Adanya senyawa kimia flavonoid, alkaloid, saponin, dan tannin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada ekstrak metanol daun dan batang krokot (*Portulaca oleracea*). Ekstrak metanol daun dan batang krokot (*Portulaca oleracea*) optimal menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 100%.

RUJUKAN

- Andareto, O. 2015. **Apotik Herbal di Sekitar Anda(Solusi Pengobatan 1001 Penyakit Secara Alami)**. Jakarta. Pustaka Ilmu Semesta.
- Arisman. 2009. **Keracunan Makanan: Buku Ajar Ilmu Gizi**. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Brock, T.D. and Madigan, M.T., 1991.**Biology of microorganisms (6th ed.)**Prentice hall.Eaglewood cliffs, New Jersey. USA. Pp. 771-775.
- Darmadi. 2008. **Infeksi Nasokomial: Problematika dan Pengendaliannya**. Jakarta. Penerbit Salemba Medika.
- Davis, W. W. dan Stout, T. R. 1971.Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay.Applied Microbiology. 22 (4): 659-665
- DepKes RI. 1995. **Farmakope Indonesia Edisi IV**. Jakarta. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dewi F K, 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* Linnaeus) Terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar.**Skripsi**. Surakarta: Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Dwijoseputro. 1978. Perbandingan Kualitas Es di Lingkungan Al-Azhar Indonesia dengan Restoran *Fast food* di Daerah Senayan dengan Indikator Jumlah *Escherichia coli* Terlarut **Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains dan Teknologi**. Vol 1. No 1.
- Ekawati, D. 2014. **Waspada Penyakit Sehari-hari**. Surabaya. Alfasyam Publishing
- Fajjriyah, N. 2017. **Kiat Sukses Budidaya Bawang Merah**. Yogyakarta. Bio Genesis
- Harborne J B, 1987. **Metode Fitokimia**. Bandung: ITB Press.
- Hasan, M Iqbal. 2002. **Pokok-pokok Materi Statistika 1 (Statistik Deskriptif). Edisi Kedua**. PT. Bumi Aksara. Jakarta.

- Juliantina.F.R., Citra, D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T. dan Bowo, E.T. 2008. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakteri Terhadap Gram Positif dan Gram Negatif.
- Karlina C Y., Ibrahim Muslimin., Trimulyono Guntur. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herba Krokot (*Portulaca oleracea* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. **Lentera Bio** vol 2 no 1 (87-93).
- Lathifah Q A, 2008. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Senyawa Antibakteri Pada Buah Belimbing Wuluh (*Everrhoa bilimbi* L). dengan Variasi Pelarut. **Skripsi**. Malang: Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang.
- Misnadiarly, 2014. **Mikrobiologi untuk Klinik dan Laboratorium**. Jakarta. Rineka Cipta.
- Pelczar, M. J. And E. C. S. Chan. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Universitas Indonesia Press. Jakarta; 1988
- Pratiwi, T. S. **Pemanfaatan Mikroorganisme Sebagai Indikator Uji**. Erlangga. Jakarta; 2008
- Radji, M. 2013. **Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran**. Jakarta. Buku Kedokteran EGC
- Redha, A. 2013. **Efek Lama Maserasi Bubuk Kopra terhadap Randemen, Densitas, dan Bilangan Asam Biodisel yang Dihasilkan dengan Metode Transesterifikasi In Situ**. Julian Belian vol 10 No 2 Sep 2013. 218-224.
- Ryadi, A. 2016. **Ilmu Kesehatan Masyarakat**. Yogyakarta. CV. Andi OFESET
- Siswoyo, P. 2009. **Alternatif Obat dengan Tumbuhan Alami Tumbuhan Berkhasiat Obat**. Yogyakarta. Absolut.
- Sudira, I. W., Merdana, I., & Wibawa, I. 2011. **Uji Daya Hambat Ekstrak daun Kedondong (*Lannea grandis* Engl) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Erwina caratovora***. *Bulletin Veteriner Udayana*, 3(1), 45-30
- Thomson, J. H., and Ewer, S.R. 1989, **How Should R&D Report Its Expenditures?** . *Research and Development*, 31(2):174-176. Diakses 13 Desember 2017.

