

Potensi Antibakteri dan Antibiofilm Ekstrak Etanol Bunga Bintaro (*Cerbera odollam*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Dwi Rahma Suci Lestari^{a*}, Lisa Soegianto^a, Liliek S. Hermanu^a

^aFakultas Farmasi, Unika Widya Mandala Surabaya

Cerbera odollam termasuk dalam jenis tanaman yang berpotensi bisa menghambat pertumbuhan bakteri yang menyebabkan penyakit infeksi. Penggunaan antibiotik yang tidak benar pada penyakit infeksi sering menyebabkan resistensi bakteri. Bakteri resisten adalah bakteri patogen yang mampu membentuk biofilm pada makhluk hidup. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas antibakteri dan antibiofilm ekstrak etanol dari bunga *Cerbera odollam* terhadap *Staphylococcus aureus*. Ekstrak etanol diperoleh dengan metode maserasi dan pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Ekstrak etanol bunga Bintaro dibuat dalam konsentrasi 10%, 20% dan 30% yang digunakan untuk uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi sumuran dan aktivitas antibiofilm diuji dengan metode mikrodilusi. Dari penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga *Cerbera odollam* memiliki Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) pada konsentrasi 10% sebesar $21,66 \pm 0,73$ mm, konsentrasi 20% sebesar $25,66 \pm 1,50$ mm dan konsentrasi 30% sebesar $27,10 \pm 1,06$ mm, sedangkan untuk uji hasil antibiofilm mampu menghambat pembentukan biofilm terbesar di konsentrasi 3,75% dengan persentase penghambatan sebesar 98,29%. Hasil bioautografi menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dari bunga *Cerbera odollam* adalah alkaloid dan tanin.

Kata kunci: *Cerbera odollam*, antibakteri, antibiofilm, bioautografi, *Staphylococcus aureus*

Antibacterial and Antibiofilm Potential of The Ethanolic Extract of Suicide Tree (*Cerbera odollam*) Flower against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Cerbera odollam was one of the plants that can inhibit the growth of bacteria that cause infectious diseases. The misuse of antibiotic in the treatment of infection frequent caused bacterial resistance. One of the forms of antibiotic resistance was the capability of microorganism forming biofilm. This study was conducted to determine the antibacterial and anti-biofilm activity of ethanolic extract from *Cerbera odollam* flower against *Staphylococcus aureus*. The ethanolic extract obtained by maceration method using 96% ethanol as a solvent. The ethanol extract of Suicide tree (10, 20 and 30%) were tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* using well diffusion method and anti-biofilm activity using microdilution method. Based on the results, ethanol extract of flowers *Cerbera odollam* inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* with inhibition zone of 21.66 ± 0.73 mm (10%), 25.66 ± 1.50 mm (20%) and 27.10 ± 1.06 mm (30%). The ethanol extract of Suicide tree flower inhibit biofilm formation 98.29% at the concentration of 3.75%. The bio autography results showed that alkaloid and tannin responsible as bioactive compounds from the ethanol extract Suicide tree flower.

Keywords: *Cerbera odollam*, antibacterial, antibiofilm, bioautografi, *Staphylococcus aureus*

*Corresponding author: Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Jl. Raya Kalisari Selatan No. 1 Surabaya, e-mail: dwirahma627@gmail.com

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang terus berkembang dari waktu ke waktu. Infeksi disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, protozoa dan beberapa kelompok minor lain seperti mikroplasma, dan klamidia (O'toole *et al.*, 2000). Sebagai pertahanan diri, bakteri membentuk suatu lapisan lendir yang disebut dengan biofilm. Biofilm merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matrik ekstraseluler yang disebut *Extracellular Polymeric Substance* (EPS), dimana EPS merupakan produk yang dihasilkan sendiri oleh mikroorganisme tersebut dan dapat melindungi dari pengaruh buruk lingkungan (Prakash, Veeragowda and Krishnappa, 2003). Beberapa contoh bakteri yang dapat menyebabkan infeksi dan membentuk biofilm adalah *Staphylococcus aureus*.

Biofilm saat ini dianggap sebagai mediator utama infeksi, dengan perkiraan 80 % kejadian infeksi berkaitan dengan pembentukan biofilm (Archer *et al.*, 2011). Hal ini disebabkan pembentukan biofilm pada mikroorganisme dapat meningkatkan toleransi terhadap antimikroba dan desinfektan, sehingga biofilm berperan besar dalam terjadinya resistensi dan penyakit kronis. Terapi antibiotik pada umumnya hanya akan membunuh sel-sel yang bersifat planktonik, sedangkan bentuk bakteri yang tersusun rapat dalam biofilm akan tetap hidup. Hal ini dikarenakan antibiotik tidak dapat menembus lapisan biofilm (Mah dan Toole, 2001).

Obat tradisional dapat menjadi alternatif dalam pengobatan infeksi. Senyawa alami yang berpotensi sebagai antibakteri adalah mengandung steroid, tanin, polifenol, flavonoid (Rahman, Paul dan Rahman, 2011), alkaloid, saponin (Ahmed *et al.*, 2008). Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antibakteri alami adalah tanaman bintangoro (*Cerbera odollam*).

Penelitian Ahmed *et al.*, (2008) menunjukkan ekstrak metanol biji bintangoro mampu menghambat beberapa bakteri seperti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, dan *Shigella dysenteriae*. Zona hambatan terhadap bakteri *Salmonella typhi* sebesar 15 mm dan *Staphylococcus aureus* sebesar 6 mm, dengan konsentrasi ekstrak 50 µg/mL.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas dan belum adanya laporan mengenai aktivitas antibakteri dan antibiofilm ekstrak bunga bintangoro terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri dan antibiofilm ekstrak bunga bintangoro terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan tujuan untuk menemukan golongan antibakteri baru yang dapat membunuh bakteri dan menghambat pertumbuhan bakteri pembentuk biofilm.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah ekstrak etanol 96% bunga bintangoro, kloroform P, air panas, kertas saring bebas abu, kertas saring, silika pengering, asam sulfat encer P, serbuk Mg, larutan alkohol klorhidrik, amil alkohol, CHCl₃, HCl 10% v/v, pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer, FeCl₃, larutan gelatin, NaOH 1N, *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Merck, Germany), *Mueller Hinton Broth* (MHB) (Merck, Germany), DMSO (Merck Schuchardt, Germany), aquadest steril), *Trypticase Soy Broth* (TSB) (Merck, Germany), H₂SO₄ 1% (Fluka Riedel de Haen, Germany), BaCl₂ (Merck, Germany), *microplate*, akuades, sumuran, larutan kristal violet 1%.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut timbangan analitis (Sartorius TE 214 S, Germany), corong pisah, cawan porselen, eksikator, krus silikat, penangas air, lemari pendingin (Sanyo, Jepang), *micropipet*, *microplate reader* (Thermofisher Scientific, Amerika), lampu UV, Chambers, *Laminar Air Flow* (LAF) (Type V-130, Indonesia), inkubator (Mommert and Binder, Germany), oven (Mommert, Germany), autoklaf (All America Model 25x, USA), mikroskop (Olympus, Jerman), *vorteks* (Labinco, Belanda), *hot plate* dan *magnetic stirrer* (Faithful SH-3, China).

Tahapan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga dari tanaman bintangoro (*Cerbera odollam*) segar yang diperoleh dari daerah Surabaya bagian Timur pada bulan Agustus tahun 2016 dan distandarisasi di Laboratorium Fitokimia-Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya. Determinasi tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran dari tanaman. Determinasi tanaman bunga bintangoro (*Cerbera odollam*) dilakukan oleh UPT Materia Medica. Ekstrak diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Uji Aktivitas Antibakteri secara Difusi

Suspensi bakteri uji yang sudah di setarakan dengan 0,5 Mc Farland I (~1,5 x 10⁸ CFU/ml) diinokulasikan sebanyak 0,25ml ke dalam 25 ml media MHA 50°C dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Media MHA dipindahkan ke dalam cawan petri steril dan dirotasi. Pra-pengeraman dilakukan selama 1,5-2 jam pada suhu 37°C. Sumuran dibuat menggunakan perforator dengan diameter 6 mm. Konsentrasi 10 %; 20% dan 30% ekstrak bunga bintangoro dimasukkan sebanyak 20 µl ke dalam sumuran dan Tetrasiklin HCl sebanyak 20µl yang dimasukkan ke dalam sumuran digunakan sebagai kontrol positif. Untuk kontrol negative

menggunakan DMSO 2%. Media diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Diameter hambat pertumbuhan diukur dengan jangka sorong.

Uji Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm (Soegianto, 2012)

Microplate U-bottom 96 well masing-masing diisi dengan ekstrak kental (konsentrasi 30%) sebanyak 100 µl, suspensi bakteri yang sudah disetarakan dengan 0,5 Mc Farland I sebanyak 20 µl pada masing-masing sumuran, dan TSB (*Tryptic Soy Broth*) 2,5% sebanyak 100 µl. Sebagai kontrol positif dibandingkan digunakan tetrasiklin HCl sebanyak 100 µl. Kontrol negatif berisi media TSB yang mengandung glukosa 2,5%. Kontrol positif berisi suspensi bakteri konsentrasi

1,5 x 10⁵ CFU/ml dan media TSB *Microplate* diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C (dalam kondisi lembab sebelum masuk inkubator). Setelah inkubasi, isi sumuran dibuang dan dibilas 3 kali dengan air mengalir dan keringkan dalam inkubator 37°C selama 15 menit. Masing-masing sumuran diberi *crystal violet* 1% sebanyak 200 µl selama 15 menit pada suhu ruang yang berguna untuk mewarnai biofilm yang terbentuk. *Microplate* dicuci atau dibilas dengan air mengalir sebanyak 2 kali. Masing-masing sumuran diberi tween 2% sebanyak 200 µl selama 15 menit yang digunakan untuk melarutkan cincin biofilm yang terbentuk. *Microplate reader* dimasukkan dan *dishake* selama 30 detik, absorbansi dibaca pada λ 595 nm.

$$\% \text{ penghambatan Biofilm} = \left(1 - \frac{\text{DO sampel}}{\text{DO kontrol positif}} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

DO	= Densitas Optik
DO sampel	= DO rata-rata abs. sampel – DO rata-rata abs. kontrol ekstrak
DO kontrol positif	= DO rata-rata abs. kontrol positif – DO rata-rata abs. Kontrol negatif
Kontrol negatif	= media pertumbuhan
Kontrol positif	= media pertumbuhan dengan suspensi bakteri
Kontrol ekstrak	= media + ekstrak etanol tanaman + larutan DMSO

Penentuan Golongan Senyawa Antibakteri pada Ekstrak dengan Bioautografi

Bioautografi menggunakan ekstrak bunga *Cerbera odollam* yang ditimbang sebanyak 0,3g dan dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 10 ml ke dalam labu takar. Ekstrak tersebut kemudian ditotolkan ke plat KLT sebanyak 15 µl dengan konsentrasi 3% dan di eluasi menggunakan n-butanol, asam asetat dan air perbandingan 4:1:5. Plat KLT selanjutnya di tempelkan pada media agar selama 1 jam. Media agar adalah media agar padat yang berisi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* konsentrasi 10⁶ CFU/ml yang telah di pra-inkubasi 1,5-2 jam (Valeri, 2014), selanjutnya media agar diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Daerah bening pada media, menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri oleh kandungan senyawa antibakteri dari ekstrak. Plat KLT yang telah dieluasi diamati pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm serta pereksi semprot *Dragendorff*, *Liebermann-Burchard*, FeCl₃, dan AlCl₃, kemudian dilakukan perhitungan nilai *Rf*.

Pada uji bioautografi, penentuan golongan senyawa aktif dilakukan dengan menggunakan beberapa penampak noda, yaitu FeCl₃ AlCl₃, pereaksi *Dragendorff*, dan pereaksi *Liebermann-Burchard* (gambar 2). Noda ekstrak etanol bunga bintaro pada *Rf* 0,18 dengan penampak noda *Dragendorff* memberikan hasil positif warna merah jingga yang menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid. Noda ekstrak etanol bunga bintaro pada *Rf* 0,58 dengan penampak noda FeCl₃ memberikan hasil positif warna hijau kehitaman yang menunjukkan adanya tanin. FeCl₃ menghasilkan warna hijau kebiruan yang

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bunga bintaro yang digunakan adalah bunga segar berwarna putih dengan mahkota bunga berbentuk tabung, pada bagian tengahnya berwarna kuning. Bunga memiliki lima petal yang sama dan beraroma khas. Sebelum digunakan bunga dideterminasi terlebih dahulu dengan tujuan untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi secara makroskopis bunga bintaro terhadap keputus-takaan.

Dari hasil pengujian diperoleh bahwa ekstrak bunga bintaro pada konsentrasi 10%, 20%, 30% memberikan DHP (Daerah Hambat Pertumbuhan) rata-rata 21,66±0,73 mm, 25,66±1,50 mm, 27,10±1,06 mm terhadap *Staphylococcus aureus*. Perbandingan Tetrasiklin HCl memberikan DHP rata-rata 30,54±0,83 mm terhadap *Staphylococcus aureus* dan dari hasil di atas diketahui bahwa ekstrak bunga bintaro memiliki daya antibakteri (Tabel 1 dan gambar 1).

menunjukkan adanya senyawa tanin (Wagner, Bladt dan Zgainski, 1984).

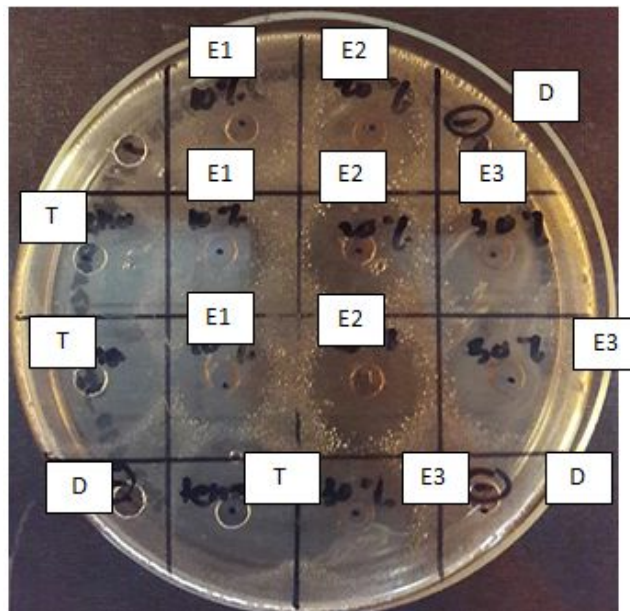
Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh, terganggunya sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dindingnya sel hanya meliputi membran sel (Cowan, 1999). Golongan senyawa fenolik tanin merupakan senyawa golongan

polifenol yang dapat merusak membran sel akibat denaturasi protein bakteri (Cowan, 1999).

Pengujian antibiofilm dilakukan menggunakan metode mikro dilusi dengan pengenceran berderet menggunakan *microplate*. *Microplate* berisi larutan ekstrak dengan konsentrasi 30% pada konsentrasi awal. Media TSB-glukosa 2,5% digunakan sebagai larutan pengencer karena glukosa dapat membantu pertumbuhan biofilm, konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan adalah $1,5 \times 10^5$ CFU/ml. Pewarnaan biofilm menggunakan kristal violet 1%. Kristal violet yang larut dalam air akan terdisosiasi menjadi ion kristal violet yang bermuatan positif dan ion klorida bermuatan negatif. Ion kristal violet yang bermuatan positif akan berikatan dengan molekul-molekul bermuatan negatif sehingga biofilm akan berwarna violet. Pengamatan persentase penghambatan pembentukan biofilm pada gambar 3 menunjukkan ekstrak etanol bunga bintaro dapat menghambat pertumbuhan biofilm *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan kontrol negatif. Pada konsentrasi 3,75 % menunjukkan hasil penghambatan biofilm sebesar 98,29 %. Pada konsentrasi 1,875 % mengalami penurunan, prosentase ini terus menurun hingga yang terkecil adalah persentase penghambatan sebesar 17,68% pada konsentrasi 0,23%. Namun pada konsentrasi 0,11% mengalami kenaikan menjadi 44,93 %. Hal ini

terjadi kemungkinan karena konsentrasi yang tinggi mengalami kejenuhan yang berarti ekstrak sukar larut pada pelarutnya (Kanja, 2017). Sedangkan pada konsentrasi 7,5%-30% penghambatan pertumbuhan biofilm diatas 100% diduga karena adanya ekstrak menempel pada dinding microplate sehingga akan mengikat kristal violet sehingga absorbansi kristal violet yang terbaca besar yang menunjukkan penghambatan biofilm berkurang sehingga berdampak pada prosentase penghambatan biofilm yang menjadikan lebih dari 100%.

Teori lain oleh Aenderek (2005) yang menyebutkan bahwa mekanisme penghambatan pertumbuhan biofilm dapat dengan cara menembus dinding sel bakteri sehingga dapat mengganggu sinyal komunikasi (*Quorum sensing*) antar bakteri yang berperan dalam pembentukan biofilm atau menginaktivasi gen-gen pada bakteri yang memicu sintesis EPS. Pada aktivitas ini, ekstrak bunga bintaro dengan konsentrasi 15% yang memiliki kekeruhan tinggi dibanding yang lain tentunya tidak dapat menembus sel bakteri secara maksimal dibandingkan dengan konsentrasi rendah. Namun hasil yang diperoleh lebih dari 100% dapat disebabkan karena menempelnya ekstrak pada dinding yang dapat mengakibatkan absorbansi yang didapat lebih besar sehingga prosentase penghambatan juga besar.



Gambar 1. Hasil uji daya antibakteri pada bunga bintaro, DMSO 2% dan perbandingan Tetrasiklin HCL $8\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 pada media MHA dengan metode difusi sumuran.

Keterangan :

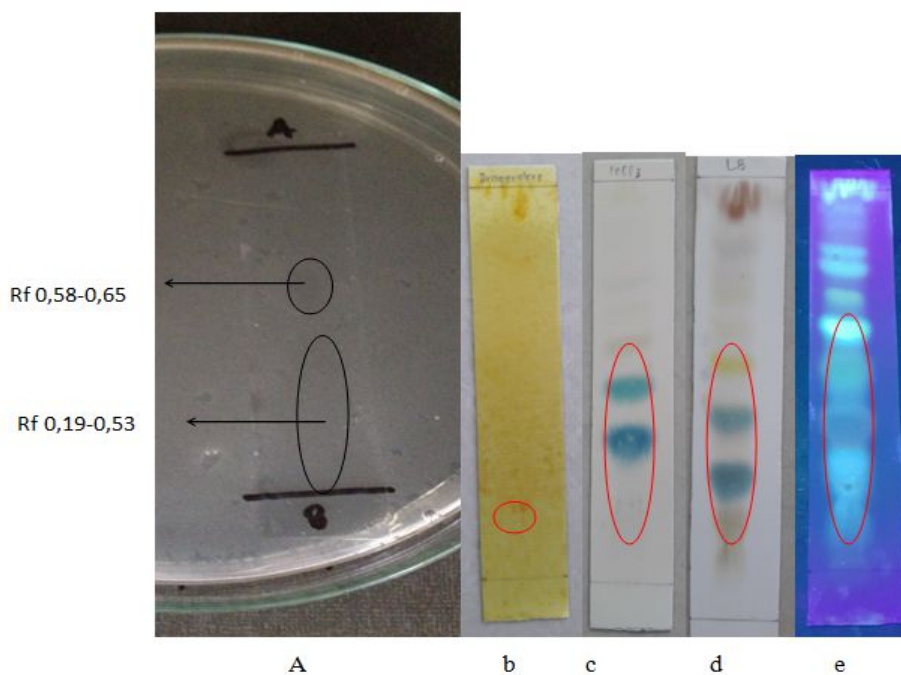
- E1 : Ekstrak bunga bintaro dengan konsentrasi 10%
- E2 : Ekstrak bunga bintaro dengan konsentrasi 20%
- E3 : Ekstrak bunga bintaro dengan konsentrasi 30%
- T : Tetrasiklin HCL $8\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ sebagai pembanding antibiotika
- D : DMSO 2% sebagai pembanding negative

Tabel 1. Hasil Pengukuran Diameter Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) Bunga Bintaro, Pembanding Tetrasiklin HCl 8µg/20µl dan DMSO 2% terhadap *Staphylococcus aureus*

Replikasi	Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) (mm)				
	Ekstrak			Tetrasiklin HCl	DMSO 2%
	10%	20%	30%		
1	21,10	23,65	27,95	30,05	-
2	21,40	25,20	27,95	31,50	-
3	22,50	26,65	26,10	30,07	-
$\bar{x} \pm SD$	21,66±0,73	25,66±1,50	27,10±1,06	30,54±0,83	-

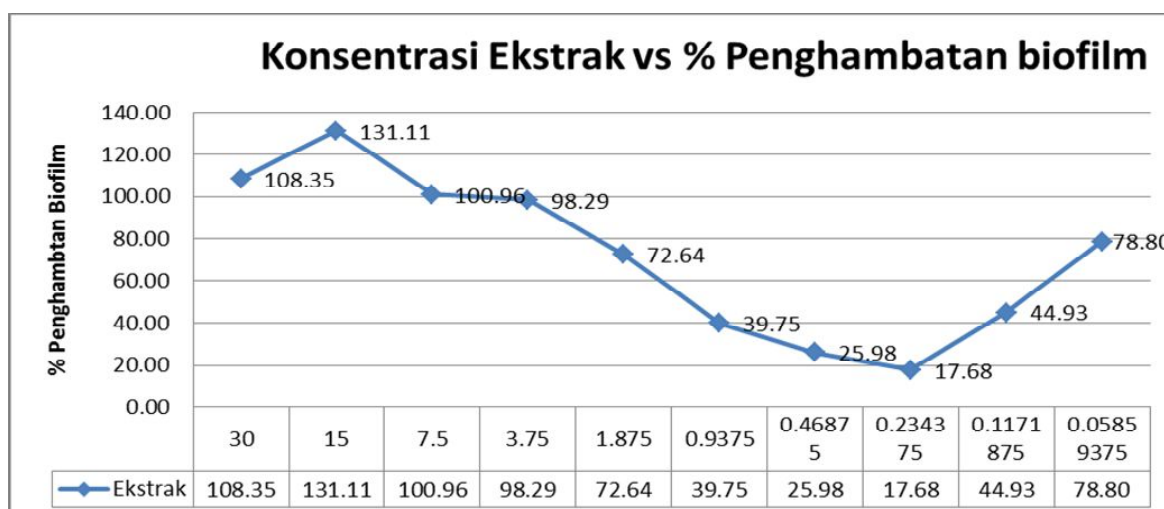
Keterangan :

1. Pengukuran diameter DHP dilakukan dengan diameter sumuran 6 mm.
2. - = Tidak terdapat Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP)



Gambar 2. Hasil pengujian bioautografi ekstrak bunga bintaro terhadap *Staphylococcus aureus*

- a. Hasil uji bioautografi pada lempengan agar
- b. Hasil KLT dengan pereaksi *Dragendorff*
- c. Hasil KLT pereaksi $FeCl_3$ dan dipanaskan
- d. Hasil KLT pereaksi *Liebermann-Burchard* dengan pemanasan
- e. Hasil KLT pereaksi $AlCl_3$ pada lampu UV 366 nm.



Gambar 3. Grafik persentase penghambatan biofilm ekstrak pada berbagai konsentrasi

KESIMPULAN

Ekstrak etanol bunga bintangoro (*Cerbera odollam*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dengan adanya DHP (Daerah Hambat Pertumbuhan) pada konsentrasi 10 % sebesar 21,66±0,73 mm, konsentrasi 20 % sebesar 25,66±1,50 mm dan konsentrasi 30% sebesar 27,10±1,06 dan memiliki aktivitas penghambatan biofilm *Staphylococcus aureus* dengan penghambatan pembentukan biofilm 98,29% pada konsentrasi 3,75%. Golongan

senyawa ekstrak etanol bunga bintangoro (*Cerbera odollam*) yang diduga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 adalah alkaloid dan tanin.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PPOT (Pusat Penelitian Obat Tradisional) yang telah memberi dukungan finansial terhadap penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aenderek, S, Diggle S, Song, Z, Hoiby, N, Cornelis, P, Williams Pand Camara, M. 2005. *The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in Pseudomonas aeruginosa via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication*. Microbiology 151(4), 1113-1125.
- Archer, N.K, M.J. Mazaitis, J.W. Costerton, J.G. Leid, M.E. Powers, M.E Shirliff. 2011. *Staphylococcus Aureus Biofilms Properties, Regulation and Roles in Human Disease*. Landes Bioscience. Virulence 2:5, 445-459.
- Ahmed, F., Amin, R., Shahid, IZ., & Sobhani, MME., 2008, Antibacterial, cytotoxic and neuropharmacological activities of *Cerbera odollam* seeds, *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 8 (4), 323-328.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4):564-82.
- DitJen POM RI [Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia], 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Kanja, F.S. 2017, Efektivitas Antibakteri dan Antibiofilm ekstrak etanol daun bintangoro (*Cerbera odollam*) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Skripsi*, Sarjana Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya.
- Mah TFC, dan O'Toole GA. 2001, *Mechanism Of Biofilm Resistance To Antimicrobiology Agent*. Trends In Microbiology : 9 No 1.
- Mhaske, M., Samad, B. N., Jawade, R. & Bhansali, A., 2012, Chemical Agents in Control of Dental Plaque in Dentistry: An Overview of Current Knowledge and Future Challenges, *Pelagia Research Library*, 3 (1), 268-272.
- O'Toole et al. 2000. *Biofilm formation as microbial development*. Annu Rev Microbiology. Vol 54 Hal 49-79.
- Prakash B., B.M. Veeragowda and G. Krishnappa. 2003. *Biofilms: A Survival Strategy of Bacteri*. Current Sci., 85: 1299-1307.
- Smith J.L, Fratamico P.M, Novak J.S. 2004. *Quorum sensing: a primer for food microbiologists*. Journal of Food Protection 67: 1053-1070.
- Rahman, M.D.A., Paul, P., & Rahman, A.A., 2011, Antinociceptive, Antibacterial & Diuretic Activities of *Cerbera odollam* Gaertn Roots, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2 (3), 16-23.
- Soegianto L, 2012, Isolasi dan Identifikasi Zat Antibakteri dalam Ekstrak Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.). Thesis Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E.M., 1984, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin.