

## **Antibacterial Activities of Ethyl Acetate Fraction of Methanol Extract From Sosor Bebek Leaves (*Kalanchoe pinnata* Pers.)**

Maulita Cut Nuria\* Enny Puji Astuti \* Sumantri \*\*

\* Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

\*\* Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Jogjakarta

### **Abstract**

*Kalanchoe pinnata* Pers. is one of the famous herbal in Indonesia that has been used traditionally to treat diarrhea and dysentery. Akinsulire *et al.*, (2007) proved the antibacterial effects of methanolic extract from *Kalanchoe pinnata* Pers. leaves, and its sensitive to Gram positive and negative bacteria. Aims of this research are to find out antibacterial activities of ethyl acetate fraction of methanolic extract from *Kalanchoe pinnata* Pers. leaves to Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) and Gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*), to determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the fraction, and to find out the active chemical substance of the fraction.

Methanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Pers. leaves was made by using maceration method, then the extract was partitioned gradually by using hexane, chloroform, diethyl ether and ethyl acetate. Ethyl acetate fraction was examined in vitro according to turbidimetry methods. Concentrations of the fraction were 256, 192, 160, 128, 96, 64, 32 and 16 mg/ml. The active chemical substance of the fraction was identified by Thin Layer Chromatography (TLC) method.

The result of this research shows the antibacterial activities of ethyl acetate fraction of methanolic extract from *Kalanchoe pinnata* Pers. leaves both to Gram positive bacteria and Gram negative bacteria. MIC value of the fraction to Gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) is 192 mg/ml, and Gram negative bacteria which are *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* is 192 mg/ml, but the MIC value to *Salmonella typhi* is 128 mg/ml. TLC identification show that the fraction contains flavonoid.

**Keywords :** Ethyl acetate fraction of methanolic extract from *Kalanchoe pinnata* Pers. leaves, Antibacterial activity, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Flavonoid

## Pendahuluan

Daun sosor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) secara empiris telah banyak digunakan di masyarakat untuk obat demam, obat luka, bisul, wasir dan sakit kepala (Sudarsono, dkk., 2002). Efek farmakologisnya sebagai antiradang, obat diare, disentri, menghentikan perdarahan, mengurangi pembengkakan, dan mempercepat penyembuhan (Hariana, 2008).

Penelitian terdahulu mengenai aktivitas antimikroba dari ekstrak daun *Bryophyllum pinnatum* (sinonim : *Kalanchoe pinnata* Pers.) yang diperoleh dari Oke-igbo daerah Ondo (Nigeria), menyebutkan bahwa daun diekstraksi menggunakan pelarut air, metanol, dan pelarut lain seperti *palmwine*. Ekstrak tersebut diuji terhadap beberapa bakteri Gram negatif dan Gram positif serta terhadap jamur *Candida albicans*. Uji aktivitas antimikroba dilakukan dengan metode difusi untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan metode dilusi cair untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yang dilakukan pada konsentrasi antara 4 mg/ml hingga 512 mg/ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas antimikroba yang lebih baik terhadap bakteri Gram positif (Akinsulire *et al.*, 2007).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah daun sosor bebek yang diperoleh dari desa Johorejo, kecamatan Gemuh kabupaten Kendal (Indonesia) yang diekstraksi dengan menggunakan metanol dan difraksinasi bertingkat dengan berbagai pelarut juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) dan Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*). Fraksi yang ingin diteliti adalah fraksi etil asetat. Uji kualitatif dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) juga dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam fraksi tersebut yang berpotensi sebagai antibakteri. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi dalam rangka isolasi senyawa aktif dari daun sosor bebek yang berkhasiat sebagai antibakteri.

## Bahan dan Metode

### A. Bahan yang Digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Bahan penelitian : daun sosor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) dari desa Johorejo, kecamatan Gemuh kabupaten Kendal yang dipanen pada bulan Januari 2010.
- b. Bahan penyari : metanol (berderajat teknis)

- c. Bahan untuk fraksinasi dengan metode partisi cair-cair : heksan, kloroform, dietil eter, etil asetat, metanol, aquadest (berderajat teknis).
- d. Bahan untuk uji aktivitas antibakteri dengan metode turbidimetri :
- 1) Bakteri : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 9466, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi*.
  - 2) Media : *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck), *Nutrient Agar* (NA) (Merck), *Nutrient Broth* (NB) (Merck), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) (Merck).
  - 3) Kontrol positif : Baku pembanding Kloramfenikol yang diperoleh dari PT. Sunthi Sepuri Pharmaceutical.
  - 4) Kontrol negatif : Dimetil sulfoksida (DMSO) (Merck).
- e. Bahan untuk uji KLT :
- 1) Fase diam : lempeng selulose
  - 2) Fase gerak : etil asetat - asam formiat - asam asetat – air (100:11:11:27) (pro analisa) (Wagner, 1984)
  - 3) Penampak bercak : uap amoniak
  - 4) Pembanding : Flavonoid : rutin (Kuersetin 3-rutinosid) (Sigma Aldrich).

## B. Alat yang Digunakan

Alat yang digunakan adalah blender (Miyako Tipe: BL-101 GS), perangkat alat maserasi, alat-alat gelas (Iwaki Pyrex), *rotary evaporator* (Eyela Rotary Vacuum Evaporator n-n series sb-651), oven (Memmert), timbangan analitik (Ohaus AR2140), inkubator (Binder), *micropipette* (Socorex), *waterbath* (Nuohai XMTD-204), autoklaf (All American), spektrofotometer (Shimadzu UV mini 1240), *Laminar Air Flow* (LAF) (Model : LAF 105/1 18), bejana kromatografi, lampu UV<sub>254</sub> dan UV<sub>366</sub> nm.

### C. Jalannya Penelitian

#### 1. Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman sosor bebek dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang.

#### 2. Pengumpulan dan Pengeringan Daun Sosor Bebek

Daun yang berumur  $\pm 3-4$  bulan dipetik, dicuci dan dibilas dengan air bersih mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel, kemudian ditiriskan, dan diangin-anginkan. Pengeringan daun sosor bebek dilakukan dengan oven pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ . Daun yang sudah kering dibuat serbuk dengan cara diblender, kemudian diayak dengan ayakan ukuran 50 mesh.

#### 3. Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Sosor Bebek

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini dilakukan dengan menyari serbuk daun sosor bebek menggunakan metode maserasi. Serbuk daun sosor bebek sebanyak 500 gram, dimasukkan ke dalam sebuah bejana, kemudian dimaserasi dengan 5 liter pelarut metanol yang dibagi menjadi 2 bagian. Bagian pertama 75% pelarut metanol yaitu 3.750 ml digunakan untuk maserasi bagian pertama, ditutup dan dibiarkan selama 2 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk. Setelah 2 hari campuran tersebut diserkai, diperas, dipisahkan filtrat (1) dan ampasnya. Kemudian ampas dicuci dengan 25% pelarut metanol yaitu sebanyak 1.250 ml, diaduk, serkai dan peras, dipisahkan filtrat (2) dari ampasnya. Ampas dibuang, filtrat (1) dan (2) dicampur. Hasil tersebut dipindahkan dalam bejana tertutup di tempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari kemudian maserat dienaptuangkan. Maserat yang diperoleh kemudian disaring dan endapannya dibuang, sedangkan filtratnya dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

#### 4. Pembuatan Fraksi Etil Asetat dari Ekstrak Metanol Daun Sosor Bebek

Ekstrak daun sosor bebek yang diperoleh ditimbang sebanyak 50 g, kemudian dilarutkan ke dalam campuran air-metanol (9:1) hingga seluruh ekstrak larut sempurna. Selanjutnya, difraksinasi secara bertingkat dengan pelarut heksan, kloroform, dietil eter dan etil asetat dengan menggunakan corong pisah. Proses ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk masing-masing pelarut. Jumlah pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sebanding dengan jumlah air yang ditambahkan ke dalam ekstrak metanol (perbandingan 1:1). Fraksi etil asetat ditampung dan diuapkan menggunakan

*waterbath* pada suhu 77°C. Fraksi etil asetat yang diperoleh diukur beratnya dan diuji aktivitas antibakterinya.

#### 5. Pembuatan Biakan Bakteri

Biakan murni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* ATCC 9466 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. Bakteri tersebut diambil menggunakan jarum ose steril dari biakan murninya, kemudian disuspensikan pada media BHI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 9466 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ditanam pada media NA, sedangkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella typhi* ditanam pada media TSIA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan tujuan untuk mendapatkan bakteri yang lebih banyak.

#### 6. Pembuatan Suspensi Bakteri

a. Komposisi larutan standar 0,5 Mc. Farland I adalah : BaCl<sub>2</sub> 0,048 M 0,5 ml dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 M 99,5 ml (Anonim, 2001).

b. Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 9466 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Satu ose biakan bakteri yang telah diremajakan pada media NA disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri tersebut diencerkan menggunakan NaCl 0,9% steril sampai kekeruhannya setara dengan larutan standar 0,5 Mc. Farland I (biakan cair yang kekeruhannya setara dengan 0,5 Mc. Farland I mempunyai populasi 1×10<sup>7</sup> CFU/ml - 1×10<sup>8</sup> CFU/ml).

c. Pembuatan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella typhi*

Satu ose biakan bakteri yang telah diremajakan pada media TSIA disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri tersebut diencerkan menggunakan NaCl 0,9% steril sampai kekeruhannya setara dengan larutan standar 0,5 Mc. Farland I.

#### 7. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dari fraksi etil asetat ekstrak metanol daun sosor bebek. Fraksi tersebut kemudian dibuat larutan stok dengan konsentrasi 512 mg/ml (Akinsulire *et al.*, 2007), dilarutkan dengan pelarut DMSO. Pengenceran dibuat dengan seri konsentrasi sebagai berikut 256, 192, 160, 128, 96, 64, 32, 16 mg/ml.

#### 8. Aktivitas Antibakteri dengan Metode Turbidimetri

Larutan uji sebanyak 1,0 ml dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi yang telah disiapkan dan dilakukan replikasi 3 kali. Sebanyak 9,0 ml inokulum ditambahkan ke dalam tiap tabung dan setelah lengkap pengisian pada tabung segera diukur absorbansinya pada panjang gelombang 530 nm. Tabung-tabung tersebut kemudian ditempatkan dalam inkubator dengan suhu yang dipertahankan pada 36°C sampai 37,5°C selama 2 sampai 4 jam. Setelah inkubasi, 0,5 ml larutan formaldehida encer ditambahkan ke dalam tiap tabung, dan diukur kembali serapannya pada panjang gelombang 530 nm. Untuk kontrol positif digunakan 1,0 ml antibiotik kloramfenikol 1% sedangkan untuk kontrol negatif digunakan 1,0 ml pelarut DMSO. Pada setiap kontrol tersebut ditambahkan 9,0 ml inokulum, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 530 nm, diinkubasi, dan ditambahkan formaldehid encer kemudian dilanjutkan penetapan seperti di atas (Anonim, 1995).

#### 9. Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Bejana pengembang sebelumnya telah dijenuhi dulu dengan fase gerak yang akan digunakan. Larutan uji ditotolkan pada lempeng sellulose dan dielusi dengan fase geraknya. Lempeng sellulose dikeringkan kemudian diamati pada sinar UV<sub>254</sub> dan UV<sub>365 nm</sub> lalu dideteksi dengan penampak bercak uap amoniak.

#### 10. Analisis Data

Pembacaan hasil uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan melihat adanya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan peningkatan jumlah sel yang mengakibatkan meningkatnya kekeruhan. Kekeruhan yang terjadi umumnya berbanding lurus dengan serapannya, yang berarti semakin banyak jumlah sel maka akan terlihat semakin keruh dan serapannya akan semakin besar. Jika tidak terjadi perbedaan antara sebelum dan sesudah inkubasi pada konsentrasi terkecil, maka konsentrasi tersebut adalah konsentrasi hambat minimum zat antibakteri (Lorian, 1980).

Hasil identifikasi golongan senyawa aktif dilakukan dengan melihat kromatogram berdasarkan warna yang terbentuk pada bercak dan kesesuaian bercak senyawa uji dengan bercak senyawa standar. Setelah itu dilakukan penghitungan nilai faktor retardasi (*R<sub>f</sub>*) pada masing-masing bercak.

### **Hasil dan Pembahasan**

#### **A. Proses Ekstraksi Daun Sosor Bebek**

Serbuk daun sosor bebek diekstraksi menggunakan metode maserasi yang didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat aktif ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1987). Cairan penyari yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol. Pemilihan metanol sebagai larutan penyari untuk ekstraksi daun sosor bebek dikarenakan metanol banyak digunakan untuk ekstraksi tanaman obat dan dapat menarik zat aktif yang terkandung di dalamnya sebanyak-banyaknya (Noor, dkk., 2006). Ekstrak yang dihasilkan dari proses evaporasi adalah 150 g, sehingga rendemen hasil yang diperoleh adalah 30 %<sup>b/b</sup>.

#### **B. Proses Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Sosor Bebek**

Fraksinasi merupakan tahapan dari proses isolasi yang paling penting, yaitu membuat suatu campuran menjadi lebih sederhana dari suatu campuran yang kompleks (Muhtadi, 2009). Proses fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan polaritas pelarut, dimulai dengan pelarut yang bersifat non polar (heksan, kloroform) kemudian pelarut yang bersifat semi polar (dietil eter, etil asetat). Fraksi etil asetat yang diperoleh setelah diuapkan adalah 20,580 g, sehingga rendemen hasil yang diperoleh adalah 4,11 %<sup>b/b</sup>.

#### **C. Uji Aktivitas Antibakteri**

Aktivitas antibakteri diuji dengan metode turbidimetri karena metode ini memiliki beberapa keuntungan yaitu : (1) memungkinkan diperolehnya suatu hasil kuantitatif, yang menunjukkan jumlah obat (senyawa uji) yang diperlukan untuk menghambat (mematikan) mikroorganisme yang diuji, (2) metode ini dikerjakan dengan peralatan yang otomatis dan memiliki tingkat presisi yang tinggi sehingga kesalahan yang terjadi juga kecil, (3) tidak membutuhkan waktu inkubasi yang lama (lebih cepat waktu pengerjaannya), (4) tidak memerlukan bahan uji dalam jumlah yang banyak sehingga praktis untuk dilakukan (Jawetz *et al.*, 2005).

Pengujian dilakukan dengan berbagai tingkat konsentrasi dari larutan uji. Efektivitas fraksi tersebut ditentukan dengan cara menghitung nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang dihasilkan. Pengujian pada konsentrasi bertingkat ini dimaksudkan untuk mengetahui apakah kenaikan konsentrasi akan meningkatkan aktivitas antibakterinya. Semakin kecil nilai KHM yang dihasilkan maka efektivitasnya akan semakin besar. Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut dari larutan uji yakni DMSO. Kontrol negatif ini berfungsi untuk membuktikan bahwa pelarut tidak memiliki pengaruh terhadap aktivitas antibakteri yang ditimbulkan oleh larutan uji. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol karena antibiotik ini sensitif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif yang digunakan dalam penelitian ini. Pengukuran absorbansi dari larutan uji dilakukan sebelum dan sesudah inkubasi. Bila absorbansi yang dihasilkan sebelum inkubasi dan setelah inkubasi tidak terlampau jauh berbeda pada konsentrasi terendah, maka konsentrasi tersebut adalah nilai KHM dari larutan uji. Tabel I menyajikan nilai KHM dari fraksi etil asetat pada berbagai bakteri.

**Tabel I. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari Fraksi Etil Asetat Ekstrak Metanol Daun Sosor Bebek pada Berbagai Bakteri**

No.	Bakteri	Nilai KHM
1.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	192 mg/ml
2.	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9466	192 mg/ml
3.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	192 mg/ml
4.	<i>Salmonella typhi</i>	128 mg/ml
5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	192 mg/ml

Perbedaan konsentrasi dari larutan uji ternyata memberikan pengaruh yang berbeda pula terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri uji. Nilai KHM pada bakteri Gram positif menunjukkan nilai KHM yang sama yaitu 192 mg/ml, tetapi nilai KHM pada bakteri Gram negatif berbeda. Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Pseudomonas aeruginosa* memiliki nilai KHM 192 mg/ml sedangkan *Salmonella typhi* memiliki nilai KHM 128 mg/ml. Hasil ini menunjukkan selektivitas fraksi etil asetat terhadap bakteri uji. Fraksi



etil asetat lebih selektif terhadap bakteri Gram negatif khususnya *Salmonella typhi* dibandingkan terhadap bakteri Gram positif, karena nilai KHM dari Gram negatif (*Salmonella typhi*) lebih rendah.

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa kontrol positif (kloramfenikol) mampu menghambat pertumbuhan sel bakteri yang ditandai dengan berkurangnya kekeruhan dan menurunnya serapan setelah inkubasi yang diukur dengan spektrofotometer, sedangkan kontrol negatif (dimetil sulfoksida) tidak mampu menghambat pertumbuhan sel bakteri yang ditandai dengan meningkatnya kekeruhan dan serapan setelah inkubasi yang diukur dengan spektrofotometer.

D. Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Metode KLT

Fraksi etil asetat dapat menyari senyawa flavonoid yang terkandung di dalam daun sosor bebek. Oleh karena itu dilakukan identifikasi flavonoid secara kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Kromatogram dari fraksi etil asetat menunjukkan bercak berwarna kuning pada daerah visibel dengan  $R_f$  sebesar 0,75 dan 0,98. Hal ini dapat terjadi karena perbedaan polaritas dari komponen aktif yang terkandung dalam fraksi etil asetat, dimana komponen kimia dari senyawa uji bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben (fase diam) terhadap komponen kimia berbeda-beda, sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya (Muhtadi, 2009). Aktivitas antibakteri dari fraksi etil asetat kemungkinan besar diakibatkan oleh kandungan senyawa flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan mendenaturasi protein sel dan merusak keutuhan membran sel bakteri tanpa bisa diperbaiki lagi (Pelczar *et al.*, 1998).

## Kesimpulan dan Saran

### A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

1. Fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun sosor bebek (*Kalanchoe pinnata* Pers.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) dan Gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*).

2. Konsentrasi hambat minimum (KHM) fraksi etil asetat tersebut pada bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) menunjukkan nilai KHM yang sama yaitu 192 mg/ml, tetapi nilai KHM pada bakteri Gram negatif berbeda, dimana *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Pseudomonas aeruginosa* memiliki nilai KHM 192 mg/ml sedangkan *Salmonella typhi* memiliki nilai KHM 128 mg/ml.
3. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mengandung senyawa golongan flavonoid.

#### B. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi senyawa aktif dari fraksi etil asetat ekstrak metanol daun sosor bebek untuk mengetahui senyawa flavonoid yang terkandung di dalamnya.
2. Perlu dilakukan uji molekuler terhadap fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun sosor bebek untuk mengetahui mekanisme molekulernya dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

#### Daftar Pustaka

- Anonim, 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, hal. 189, 1007-1008, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim, 2001, *McFarland Standards*, PML Microbiologicals Inc., Wilsonville, hal. 1-2.
- Akinsulire, O.R., Aibinu, I.E., Adenipekun, T., Adelowotan, T., and Odugbemi, T., 2007, In Vitro Antimicrobial Activity Of Crude Extracts From Plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*, *African Journal Traditional CAM* (2007), **4 (3)**, hal. 338-344.
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia (Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan)*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Edisi 2, hal. 47, 49, 70, ITB, Bandung.
- Hariana, A., 2008, *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*, Cetakan ke-4, hal. 94-95, Penebar Swadaya, Jakarta.

- Jawetz, E., Melnick, J.L., and Adelberg, E., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Buku I, diterjemahkan oleh Eddy Mudihardi, Edisi XXII, hal. 160, 194, 211, 244, EGC, Jakarta.
- Lorian, V., 1980, *Antibiotic in Laboratory Medicine*, hal. 189, 507-517, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, USA.
- Muhtadi, 2009, Fraksinasi dengan Kromatografi Vakum Cair, dalam *Workshop Isolasi Chemical Marker dari Bahan Alam 2009*, hal. 1-4, 6, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Noor, S.M., Poeloengan, M., dan Yulianti, T., 2006, Analisis Senyawa Kimia Sekunder dan Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L) Terhadap *Salmonella typhi* Dan *Shigella boydii*, dalam *Risalah Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006*, Balai Penelitian Veteriner, Bogor, hal. 986-992.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., and Pelczar, M.F., 1998, *Dasar-dasar Mikrobiologi*, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 46, UI Press, Jakarta.
- Sudarsono, P.N., Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus, I.G., dan Purnomo, 2002, *Tumbuhan Obat II Hasil Penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan*, hal. 111-112, Pusat Studi Obat Tradisional, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Wagner, H., 1984, *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*, hal. 164, Springer-Verlag.