

Research Report

Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao*) 6,25% dan NaOCl 2,5% Terhadap Bakteri *Streptococcus sanguinis*

Nugroho S.W.¹, Rukmo M.², Prasetyo E.A.,² Tamara Yuanita²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia

²Departemen Konservasi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia

ABSTRACT

Background: *Streptococcus sanguinis* is a gram-positive bacterium that infects and penetrates into dentinal tubules from a depth of 150 μm up to 792 μm . Chemicals, namely 2.5% NaOCl, are used to mitigate the growth of these bacteria via irrigation of the root canals, but 2.5% NaOCl still has disadvantages including irritating periradicular tissue, having an unpleasant odor, and being toxic. Due to these shortcomings, natural materials are expected to be used as alternatives. Cocoa peel extract has active tannin compounds, flavonoids, alkaloids, terpenoids, and saponins which have antibacterial attributes; a concentration of 6.25% is counted as the minimum bactericidal concentration (MBC) of *Streptococcus sanguinis*. **Aim:** To compare the difference of antibacterial power of 6.25% cocoa peel extract (*Theobroma cacao*) and 2.5% NaOCl against *Streptococcus sanguinis*. **Method:** This research is an in vitro experimental laboratory with post-test only control group design. The diffusion method was used on *Streptococcus sanguinis* planted in tubes containing BHIB, then cultured on petri dishes containing nutrient agar and divided into 3 parts, namely 6.25% cocoa peel extract, 2.5% NaOCl, and negative controls, then each Petri dishes were given a paper disc that had been dripped by 0.01 ml of each ingredient, then incubated in an incubator for 2x24 hours at 37°C; the diameter of the inhibitory zone formed was then observed using a caliper. **Results:** The average diameter of the inhibition zone formed on 6.25% cocoa peel extract was 19.2000 mm and 2.5% NaOCl was 17.2813 mm against *Streptococcus sanguinis*. **Conclusion:** The antibacterial power of 6.25% cocoa peel extract (*Theobroma cacao*) is higher than 2.5% NaOCl against *Streptococcus sanguinis*.

Keywords: Cacao peel extract, NaOCl, *Streptococcus sanguinis*.

Korespondensi: Tamara Yuanita, Departemen Konservasi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia, tamara-y@fkg.unair.ac.id, +628155130747.

PENDAHULUAN

Terapi perawatan saluran akar adalah metode untuk mengobati kerusakan pulpa yang *irreversible* demi mempertahankan gigi.¹ Tujuan utama dari perawatan saluran akar adalah untuk membersihkan mikroorganisme di saluran akar disertai oleh protokol *debridement* dan desinfeksi.² Di saluran akar terdapat korelasi langsung antara jumlah bakteri dalam saluran akar dengan ukuran lesi periapiks. Namun, hanya satu atau dua spesies bakteri yang mendominasi pada kasus kegagalan perawatan saluran akar, yaitu organisme bakteri gram positif *Enterococcus faecalis* dan *Streptococcus*

sanguinis yang mampu menembus tubuli dentin sampai kedalaman 400 μm dalam waktu dua minggu.³ Selain itu, dua bakteri tersebut juga mendominasi saluran akar hingga 88% dan dapat bertahan hingga pada pH 9.⁴

Eliminasi mikroorganisme dengan irigasi saluran akar merupakan langkah penting dalam kesuksesan terapi perawatan saluran akar.⁵ Irigasi memiliki peran untuk membunuh dan pengangkatan mikroorganisme, jaringan nekrotik dan radang serta puing-puing dentin. Selain itu, irigasi juga berfungsi untuk mengurangi gesekan antara instrumen dengan dentin, meningkatkan efektivitas pemotongan *file*,

melarutkan jaringan organik dan jaringan anorganik, mendinginkan *file* dan gigi.⁶

Natrium hipoklorit (NaOCl) adalah satu-satunya bahan yang digunakan saat ini yang dapat melarutkan bahan organik di dalam saluran akar. Namun, instrumentasi dan irigasi dengan NaOCl tidak cukup untuk membuat saluran akar bebas dari bakteri. Sekitar 40% - 60% dari kanal masih mengandung bakteri setelah perlakuan *chemomechanical* dengan konsentrasi NaOCl yang berbeda.⁷ NaOCl dapat mengiritasi jaringan periradikular vital, ketidakmampuan untuk menghilangkan *smear layer*, rasa tidak enak, toksisitas tinggi, korosif terhadap instrumen, pengurangan modulus elastis, dan kekuatan lentur dentin, dan bersifat toksik ketika diirigasi sampai ke jaringan periradikular sehingga menyebabkan rasa sakit, pendarahan, serta pembengkakan atau *oedema* yang luas.^{8,9,10}

Bahan herbal telah digunakan dalam praktik dokter gigi dan medis selama ribuan tahun dan telah menjadi populer saat ini karena memiliki aktivitas antimikroba yang tinggi, analgesik biokompatibilitas, antiinflamasi, dan antioksidan. Saat ini telah dikembangkan beberapa bahan herbal atau alami sebagai bahan alternatif irigasi saluran akar karena potensi efek samping yang sering ditimbulkan oleh larutan irigasi sintetik, seperti toksik terhadap jaringan, potensi alergi, bau dan rasa yang tidak nyaman, diskolorisasi pada gigi dan lidah, serta menyebabkan *burning sensation* pada mukosa rongga mulut.^{8,11} Salah satu dari bahan herbal tersebut adalah kakao.

Kakao (*Theobroma cacao*) merupakan salah satu komoditi ekspor negara Indonesia dengan nilai jual yang cukup tinggi dan menempati peringkat ke-3 sebagai negara penghasil kakao terbesar di dunia.¹² Hanya biji kakao saja yang diambil dan diolah oleh petani pada saat musim panen, sehingga banyak kulit buah kakao yang tidak dimanfaatkan dan menjadi limbah. Limbah kulit buah kakao mencapai 60% dari total produksi buah dan dapat menjadi masalah jika tidak ditangani

dengan baik.¹³ Kulit buah kakao banyak mengandung senyawa fenolik, seperti resinol, tanin, kuersetin, asam sinamat, pirogalol dan epikatekin-3-galat.¹⁴ Terdapat juga saponin, terpenoid, alkaloid.^{15,16} Ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) memiliki daya antibakteri dengan konsentrasi hambat minimal (KHM) terhadap bakteri *Streptococcus sanguinis* pada konsentrasi 3,125% dan konsentrasi bunuh minimal (KBM) pada konsentrasi 6,25%.¹⁷

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro* dengan rancangan penelitian *post test-only control group design*. Sampel yang digunakan adalah stok bakteri *Streptococcus sanguinis* yang didapat dari *Research Center* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Pada penelitian ini peneliti menggunakan kulit buah kakao yang didapatkan dari Banyuwangi. 1 kg kulit buah kakao dibersihkan lalu dipotong tipis-tipis hingga ketebalan 1-2 mm. Kulit buah kakao yang sudah dipotong dikeringkan dengan udara terbuka selama tiga hari. Setelah kulit buah kakao kering, dihaluskan dengan *blender* sampai menjadi serbuk halus.¹⁸ Kemudian 40 gram serbuk kulit buah kakao dimaserasi dengan menggunakan pelarut dengan cara direndam 400 ml etanol 70% dan diaduk beberapa kali, diamkan selama 24 jam di dalam erlenmeyer. Perendaman dilakukan dalam suhu ruang pada *shacker* dengan kecepatan 120 rpm secara terus-menerus selama 24 jam. Setelah 24 jam, larutan disaring dengan menggunakan kertas saring *Whatman* no. 41, sehingga diperoleh maserat. Pelarut (etanol) dalam maserat diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol dengan menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* sampai didapatkan ekstrak murni. Ekstrak pekat diambil 2 ml kemudian diencerkan dengan konsentrasi 6,25%.

Kultur *Streptococcus sanguinis* yang akan digunakan diambil dari stok *Streptococcus sanguinis* dengan menggunakan osse steril dan ditanam pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB). Kemudian, diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Kultur tersebut dicocokkan dengan standar *Mc.Farland*, kemudian ditipiskan hingga mencapai standar *Mc.Farland* 0,5 atau setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml untuk memperoleh bakteri dengan konsentrasi tertentu. Menyamakan kekeruhan suspensi bakteri dengan cara double blind dilakukan dengan memegang tabung reaksi bersebelahan dan memandangnya pada latar belakang putih bergaris hitam. Jika kekeruhan suspensi bakteri masih belum sama, suspensi bakteri dapat diencerkan atau diberi tambahan bakteri. Setelah didapatkan kekeruhan yang sama dengan standar tersebut, suspensi standar tersebut diencerkan.¹⁹

Menyiapkan 9 cawan petri berisi *nutrient* agar yang tiap cawan dibagi menjadi beberapa bagian (1 kelompok kontrol negatif dan 2 kelompok perlakuan). Mengambil biakan bakteri *Streptococcus sanguinis* dari BHIB yang telah disetarakan kekeruhannya dengan larutan *Mc Farland* 0,5. Mengusapkan biakan tersebut ke seluruh permukaan *nutrient* agar dengan menggunakan lidi kapas steril. Kultur

Streptococcus sanguinis ditanam pada media *nutrient* agar menggunakan *cotton swab* dengan metode *swab*. Mengoleskan secara merata pada permukaan agar. Meneteskan ekstrak kulit buah kakao 6,25% dan NaOCl 2,5% sebanyak 10µl pada *paper disk* atau kertas cakram. Meletakkan *paper disk* yang sudah ditetesi ekstrak kulit buah kakao 6,25% dan NaOCl 2,5% pada masing-masing permukaan agar. Inkubasi selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Pengamatan zona hambat, zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan memiliki diameter yang berbeda-beda dan bentuk yang tidak beraturan. Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter terpanjang yang terbentuk dan diameter terpendek dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm) lalu dijumlah kemudian dibagi 2 sehingga didapatkan rata-ratanya.

HASIL PENELITIAN

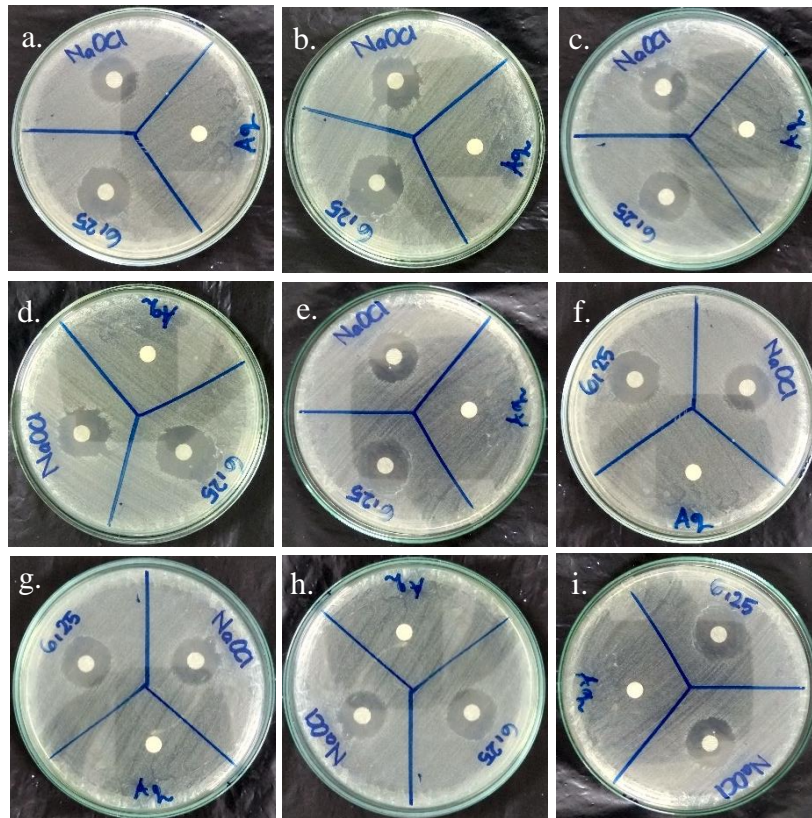
Pada awal penelitian, dilakukan pembuatan ekstrak dan uji fitokimia pada ekstrak kulit buah kakao di Balai Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI) Surabaya. Berikut adalah tabel dari hasil uji fitokimia ekstrak kulit buah kakao.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Buah Kakao

Kandungan	Persentase
Saponin	4,05%
Alkaloid	5,06%
Tanin	6,11%
Flavonoid	3,91%
Terpenoid	2,94%

Penelitian ini dilakukan untuk menguji perbedaan daya antibakteri ekstrak kulit buah kakao 6,25% dan NaOCl 2,5% terhadap bakteri *Streptococcus sanguinis* dengan metode difusi. Pada penelitian ini ada 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok konsentrasi ekstrak kulit buah kakao 6,25% yang merupakan konsentrasi bunuh

minimal ekstrak kulit buah kakao, kelompok NaOCl 2,5% dan kelompok kontrol negatif (Aquadess). Terdapat sembilan replikasi kelompok ekstrak kulit buah kakao 6,25% dan NaOCl 2,5%, serta sembilan kali replikasi kelompok kontrol. Dari penelitian yang dilakukan, terlihat hasil seperti gambar di bawah ini.



Gambar 1. Hasil perbedaan zona hambat pada ekstrak kulit buah kakao 6,25%, NaOCl 2,5% dan aquades sebagai kontrol negatif terhadap *Streptococcus sanguinis*. a. Replikasi 1, b. Replikasi 2, c. Replikasi 3, d. Replikasi 4, e. Replikasi 5, f. Replikasi 6, g. Replikasi 7, h. Replikasi 8, i. Replikasi 9.

Tabel 2. Tabel nilai hasil penelitian (mm) antibakteri ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) 6,25% dan NaOCl 2,5% terhadap bakteri *Streptococcus sanguinis*

No	Ekstrak kulit buah kakao 6,25%	NaOCl 2,5%	Kontrol Negatif
1	19,85	16,25	-
2	20,15	17,70	-
3	19,20	17,28	-
4	17,45	16,60	-
5	19,80	17,55	-
6	19,60	17,80	-
7	18,55	17,20	-
8	19,40	17,95	-
9	18,80	17,20	-
Rata-rata	19,20	17,28	-

Tabel 3. Tabel nilai rerata dan standar deviasi diameter zona hambat (mm) antibakteri ekstrak kulit buah kakao 6,25% dan NaOCl 2,5%.

Kelompok	N	Rata-Rata Diameter Zona Hambat (mm)	Standar Deviasi
Kelompok Ekstrak Kulit Buah Kakao 6,25%	9	19,2000	0,88882
Kelompok NaOCl 2,5%	9	17,2813	0,59817

Terlihat bahwa pada kelompok sampel ekstrak kulit buah kakao 6,25% menunjukkan hasil yang lebih besar

PEMBAHASAN

Cara menentukan perbedaan daya antibakteri ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao*) 6,25% dan NaOCl 2,5% terhadap bakteri *Streptococcus sanguinis*, dilakukan penelitian secara *in vitro*. Pada penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus sanguinis* yang didapatkan dari *Research Center* Fakultas Kedokteran Gigi Airlangga Surabaya menggunakan 9 replikasi sampel.

Antibakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak kulit buah kakao dengan konsentrasi bunuh minimal terhadap bakteri *Streptococcus sanguinis* yaitu 6,25%, NaOCl 2,5% dan aquades yang digunakan sebagai kelompok kontrol negatif. Untuk mengetahui kandungan yang terdapat pada ekstrak kulit buah kakao dilakukan uji fitokimia. Hasil yang didapatkan dari uji fitokimia adalah saponin (4,05%), flavonoid (3,91%), tanin (6,11%), terpenoid (2,94%), alkaloid (5,06%). Hasil tersebut membuktikan teori yang menyatakan bahwa ekstrak kulit buah kakao memiliki kandungan daya antibakteri.

Selanjutnya dilakukan penelitian dengan menggunakan metode difusi dengan membandingkan daya antibakteri antara ekstrak kulit buah kakao 6,25%, NaOCl 2,5% dan kelompok kontrol negatif

daripada kelompok sampel NaOCl 2,5%. Pada kelompok sampel negatif tidak menunjukkan hasil apapun.

yaitu aquades tanpa menggunakan bahan antibakteri. Masing-masing bahan uji ditetaskan pada *paper disk* yang sudah terletak pada media *nutrient* agar dan dibagi menjadi 3 zona kelompok. Setelah 24 jam maka akan terbentuk zona hambat pada sekeliling dari bahan uji yang telah ditetaskan kecuali pada kelompok kontrol negatif karena hasilnya tidak terdapat adanya bentukan zona hambat. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah kakao 6,25% dan NaOCl 2,5% memiliki daya antibakteri terhadap *Streptococcus sanguinis*.

Hasil yang diperoleh dari uji antibakteri rerata dan standar deviasi diameter zona hambat (tabel 3) antibakteri ekstrak kulit buah kakao 6,25% memiliki diameter 19,2000 mm, NaOCl 2,5% memiliki diameter 17,2813 mm, dan aquades sebagai kontrol negatif berdiameter 0 mm. Dari ketiga hasil uji tersebut didapatkan bahwa diameter zona hambat kelompok ekstrak kulit buah kakao 6,25% lebih panjang dibandingkan dengan kelompok NaOCl 2,5% terhadap bakteri *Streptococcus sanguinis*. Hal tersebut mungkin bisa terjadi karena mekanisme kerja dari daya antibakteri ekstrak kulit buah kakao 6,25% lebih efektif dari pada NaOCl 2,5% karena memiliki kandungan antibakteri flavanoid sebesar 3,91% yang berfungsi menghambat pertumbuhan

mikroorganisme. Mekanisme antimikroba dari flavonoid bergantung pada interaksi dengan wilayah hidrofilik dari fosfolipid pada membran sel dan penetrasi inti hidrofobik. Dengan demikian dapat menyebabkan pengurangan produksi dan pembentukan biofilm.²⁰

Saponin sebesar 4,05% berfungsi sebagai antibakteri bekerja dengan cara menghidrolisis dinding sel. Kerusakan pada dinding sel dapat menyebabkan hilangnya sifat semipermeabilitas akibat dari kerusakan membran sel, sehingga tidak dapat menyeleksi keluar-masuknya zat seperti air dan enzim. Hal tersebut mengakibatkan metabolisme sel terganggu, sehingga menghambat proses pembentukan ATP untuk pertumbuhan sel. Jika proses ini berlanjut maka akan menimbulkan kematian sel.²¹ Terdapat juga tanin sebesar 6,11% memiliki peran antibakteri melalui cara menarget pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna, hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati.²²

Alkaloid sebesar 5,06% memiliki kemampuan sebagai antibakteri karena dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk utuh

kemudian menyebabkan kematian sel. Selain itu mekanisme kerjanya melalui penghambatan sintesis dinding sel sehingga akan menyebabkan lisis pada sel yang dapat menyebabkan sel akan mati.²³ Sedangkan terpenoid sebesar 2,94% memiliki mekanisme kerja dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri melalui cara bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri yang dapat membentuk ikatan polimer kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin dapat menyebabkan keluar masuknya substansi, akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati.²¹

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter zona hambat antara kelompok ekstrak kulit buah kakao 6,25% dan NaOCl 2,5% pada penelitian ini memiliki beda yang signifikan. Perbedaan yang signifikan tersebut menunjukkan bahwa NaOCl 2,5 tidak memiliki daya antibakteri yang sebanding dengan daya antibakteri yang dimiliki ekstrak kulit buah kakao 6,25%. Ekstrak kulit buah kakao 6,25% mungkin memiliki daya antibakteri bakteri yang lebih besar dibandingkan dengan NaOCl 2,5% terhadap bakteri *Streptococcus sanguinis*.

REFERENSI

1. Hahl C, Bodenwinkler A, Sturzlinger H, 2006, Endodontic treatment of molars, Stubenring; GMS Health Technology.
2. Madhusudhana K, Lalitha G, Kumar CS, Lavanya A, 2017, Evaluation Of The Effectiveness Of Natrium Hypochlorite And Edta On Removal Of The Mixture Of Calcium Hydroxide, Chlorhexidine And Lycopene From The Root Canal: A Sem Study, Nellore; Annals and Essences of Dentistry.
3. Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. 2007. An in vitro study of PH of three calcium hydroxide dressing materials. Dent. Traumatol.
4. Lew, HP, Quah SY, Lui, JN, Bergenbaltz, G, Yu, VSH, Tan, KS. 2015. Isolation of Alkaline-tolerant Bacteria from Primary Infected Root Canals. Singapore. American Assosiation of Endodontists.
5. Silveira, LFM, Silveira, CF, Martos, J and de Castro, LAS, 2013, Evaluation of the different irrigation regimens with natrium hypochlorite and EDTA in removing the smear layer during root canal preparation, Journal of Microscopy and Ultrastructure, 1(1), 51-56.
6. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao

- Y, 2014, Irrigation in Endodontics, Vancouver; Macmillan Publishers.
7. Siqueira JF, Pinto TG, Rocas IN, 2007, Effects of Chemomechanical Preparation With 2.5% Natrium Hypochlorite and Intracanal Medication With Calcium Hydroxide on Cultivable Bacteria in Infected Root Canals, Rio de Janeiro; American Association of Endodontists.
 8. Dubey S, 2015, Comparative antimicrobial efficacy of herbal alternatives (*Emblica officinalis*, *Psidium guajava*), MTAD, and 2.5% natrium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study, Indore; Elsevier.
 9. AAE, 2011, Endodontic (Colleagues of Excellence), Chicago, Available from: https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/endodontics_colleagues_for_excellence_newsletter/rootcanalirrigantsdisinfectants.pdf.
 10. Lam, TSK, Wong, OF and Tang, SYH, 2010, A case report of natrium hypochlorite, Hong Kong Journal of Emergency Medicine, 17(2), 174-175.
 11. Pujar M, Makandar SD, 2011, Herbal Usage in Endodontics, Belgaum; International Journal of Contemporary Dentistry.
 12. Kementerian Pertanian, 2017, Fasilitas Penelitian Kakao, Upaya Dongkrak Peringkat Indonesia Penghasil Kakao Terbesar Dunia, Jakarta, Available from: http://www.pertanian.go.id/ap_posts/detail/1336/2017/11/20/10/50/06/Fasilitas%20Penelitian%20Kakao-%20Upaya%20Dongkrak%20Peringkat%20Indonesia%20Penghasil%20Kakao%20Terbesar%20Dunia.
 13. Mulyatni AS, Budiani A, Taniwiryono D, 2012; Aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*, Bogor; Menara Perkebunan.
 14. Fapohunda & Afolayan, 2012, Fermentation of Cocoa Beans and Antimicrobial Potentials of the pod Husk Phytochemicals, Journal of Physiology and Pharmacology Advances, 2 (3), 158-164.
 15. Romas A, Rosyidah DU, Aziz MA, 2015, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L) Terhadap Bakteri *Escherichia Coli* Atcc 11229 Dan *Staphylococcus Aureus* Atcc 6538 Secara In Vitro, Surakarta; University Research Colloquium.
 16. Amalia S, Wahdaningsih S, Untara EK, 2014, Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksan Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus Polyrhizus* Britton & Rose) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923, Pontianak; Jurnal Fitofarmaka Indonesia.
 17. Nurrezeki AA, Rulianto M, Yuanita T, 2017, Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao*) Terhadap Bakteri *Streptococcus sanguinis*, Surabaya; Dental Journal.
 18. Hermawan Sri, Yuli Rizky AN, Rosdanelli H, 2012, Penentuan Efisiensi Inhibisi Korosi Baja Menggunakan Ekstrak Kulit Buah Kakako (*Theobroma cacao*). Jurnal Teknik Kimia; 1 (2): 31-33.
 19. Delost, M.D. 2014. Introduction to Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences. Jones & Bartlett: University Youngstown Ohio. pp. 120-121.
 20. Liu Z, Pan Y, Li X, Jie J, Zeng M, 2017, Chemical composition, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of pummelo peel flavonoid extract, Qingdao; Elsevier.
 21. Husna Fa, Sulasmi Es, Witjoro A, 2016, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Ental Muda *Diplazium Esculentum* (Retz.) Swartz Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Dan

- Escherichia Coli Secara In Vitro, Malang; Jurnal Universitas Negeri Malang.
22. Sari FP dan Sari SM, 2011, Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha multifida* linn) sebagai bahan baku antibiotik alami, Semarang; Jurnal Universitas Negeri Semarang.
 23. Lamothe RG, Michell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F, Bouarab K, 2009, Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens, Quebec; International Journal Of Molecullar Science.