

AKTIVITAS ANTIBAKTERI METABOLIT SEKUNDER PADA KULIT BATANG GELUMPANG (*Sterculia foetida* L.)

Maria Ulfa¹, Dewa Ayu Citra Rasmi²

¹ Prog.Studi Kimia FMIPA Universitas Mataram

² Prog Studi Pendidikan Biologi, Jurusan PMIPA FKIP Universitas Mataram

Abstrak : Telah dilakukan ekstraksi dan identifikasi metabolit sekunder kulit batang Gelumpang (*Sterculia foetida* L.) dengan metode maserasi dan penapisan fitokimia menggunakan metode Ciulei. Kulit batang Gelumpang dimaserasi menggunakan pelarut *n*-heksan, DCM, metanol dan air. Gelumpang banyak digunakan sebagai obat sembelit dan encok. Untuk mendukung pemakaian secara empirik maka pada penelitian ini dilakukan uji penapisan metabolit sekunder dan uji aktivitas antibakteri terutama pada *Staphyococcus aureus* secara in vitro. Hasil penapisan menunjukkan kandungan kimia dari ekstrak kulit batang Gelumpang adalah tanin, minyak atsiri, sterol, triterpen, kumarin dan flavonoid. Hal ini diperkuat dengan data KLT (eluen *n*-heksan:DCM = 8:12). Ekstrak kulit batang Gelumpang mempunyai daya antibakteri terhadap *S.aureus* dengan diameter daerah hambat (DDH) 2,4 mm (*n*-heksan); 4,6 mm (DCM); 7,4 mm (metanol) dan 1,7 mm (air).

Kata kunci : Gelumpang, Penapisan fitokimia, KLT, *S. Aureus*

ACTIVITIES ANTIBACTERIAL SECONDARY METABOLITES THE STEM BARK OF GELUMPANG (*Sterculia foetida* L)

Abstrak : Extraction and identification of secondary compound Gelumpang (*Sterculia foetida* L.) stem bark by maseration and screening phytochemical (Ciulei method) were carried out. Maseration using *n*-hexane, dichloromethane (DCM), methanol and aquadest were employed. Gelumpang are often used as traditional medicine for stomach upset or colic and rheumatic. To support this utilization, this experiment was done to analyse the secondary compounds and to test antibacterial activity of *Staphyococcus aureus*. The results show that secondary compounds in Gelumpang extract were tannin, essential oil, sterol, triterphenoid, cumarin and flavonoid. This is supported by TLC data (eluen *n*-hexane:DCM = 8:12). Gelumpang stem bark extract has antibacterial activity on *S. aureus*. This was shown by 2,4 mm (*n*-hexane); 4,6 mm (DCM); 7,4 mm (methanol) and 1,7 mm (aquadest) of the diameter of inhibition area.

Key words : Gelumpang, screening phytochemical, TLC, *S. aureus*

I. PENDAHULUAN

Penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional cukup banyak, hal ini terlihat dari peningkatan ekspor simplisia biofarmaka ke berbagai negara tujuan. Pada tahun 2001, total nilai dagang biofarmaka dunia mencapai US\$ 45 milyar dan meningkat menjadi US\$ 5 triliun pada tahun 2005, dimana kontribusi ekspor biofarmaka Indonesia baru sekitar 0,22 % saja [1].

Peningkatan penggunaan fitofarmaka (obat herbal) oleh masyarakat karena konsep *back to nature* yang ditawarkan memberikan kesan aman dikonsumsi disamping harganya yang terjangkau dan khasiatnya diyakini ampuh sejak zaman nenek moyang.

Sterculiaceae merupakan salah satu famili tumbuhan tropis yang cukup besar, terdiri dari 60 genus dan sekitar 700 spesies termasuk genus *Heritiera* dengan 35 spesies yang ditemukan di daerah Afrika Utara, Indo-Malaysia, daerah tropis di Australia dan di daerah Pasifik [2]. Kelompok tumbuhan ini mempunyai beragam senyawa kimia yang berdasarkan hasil penelitian memiliki aktivitas fisiologis yang sangat bermanfaat bagi manusia. Keanekaragaman genetik dan sumber bahan kimia alami di Indonesia sangat potensial dikembangkan dan dimanfaatkan untuk berbagai keperluan seperti bahan obat-obatan, agrokimia, dan bahan baku industri.

Dalam rangka mencari sumber senyawa hayati baru sekaligus mencoba mengangkat tumbuhan yang belum memiliki nilai ekonomi maka dipilih tumbuhan gelumpang (*Sterculia foetida* L.) yang tergolong dalam famili Sterculiaceae sebagai bahan penelitian kali ini.

Bagian tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat sebagai bahan obat tradisional adalah kulit batang yang diyakini dapat menyembuhkan berbagai penyakit dalam serta daunnya untuk pengobatan penyakit sembelit dan encok [3].

Pengetahuan masyarakat di Indonesia akan pemanfaatan tumbuhan sebagai obat tradisional perlu pembuktian secara ilmiah agar nantinya dapat dikembangkan menjadi obat herbal (fitofarmaka) dimana mutu dan khasiatnya dapat dipertanggungjawabkan. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi daun Gelumpang dengan beberapa pelarut organik dan identifikasi komponen kimia yang terkandung dalam ekstrak tersebut atau dikenal dengan istilah penapisan/skrining fitokimia. Hal ini perlu dilakukan sebagai langkah awal dalam mengungkap potensi kimia dari tumbuhan Gelumpang dan sebagai catatan tumbuhan ini belum banyak diteliti padahal masyarakat telah lama mengenalnya sebagai tumbuhan obat.

II. METODE PENELITIAN

2.1 Sampel dan Bahan Kimia

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kulit batang tumbuhan Gelumpang yang diperoleh dari Dinas Kehutanan dan Perkebunan Kabupaten Sumbawa UPT KPH Puncak Ngengas Alas (NTB). Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah *n*-heksan, DCM, metanol, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, HCl pekat, amonia 10%, NaCl, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, FeCl₃ dan aquadest. Untuk analisis Kromatografi

Lapis Tipis (KLT) menggunakan plat KLT Kieselgel G₆₀ F₂₅₄ 0,25 mm (Merck). Uap iodine sebagai penampak noda pada plat KLT.

2.2 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan antara lain adalah pipa kapiler, chamber, seperangkat rotavapor, shaker, corong buchner, *petri disk*, mikropipet dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

2.3 Prosedur Kerja

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental yang lazim dipakai dalam penelitian eksplorasi senyawa organik bahan alam yang ada pada spesies tumbuhan yang dipilih. Secara garis besar metode penelitian mengikuti prosedur kerja sebagai berikut :

2.3.1 Tahap pemilihan spesies tumbuhan

Spesies yang dipilih untuk penelitian ini berdasarkan pendekatan etnobotani dan kemotaksonomi.

2.3.2 Tahap ekstraksi

Sampel daun dibersihkan, kemudian dikeringkan dengan oven dan diproses sebagai berikut [4]:

- Sampel daun kering dipotong kecil-kecil lalu dihaluskan dengan blender.
- Serbuk daun yang diperoleh ditimbang sebanyak 100 gr direndam dengan n-heksan (500 mL) selama 24 jam sambil dikocok dengan shaker.
- Setelah 24 jam, campuran ini disaring dan filtratnya diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak n-heksan.
- Bahan yang tidak larut pada prosedur c, dikeringkan kemudian direndam dengan DCM (500 mL) selama 24 jam sambil dikocok dengan shaker.
- Setelah 24 jam, campuran disaring dan filtratnya diuapkan hingga diperoleh ekstrak DCM.
- Selanjutnya bahan yang tidak larut pada prosedur c diekstrak dengan metanol seperti prosedur di atas hingga dihasilkan ekstrak metanol.
- Terakhir diekstrak dengan air hingga diperoleh ekstrak air.

2.3.3 Skrining Fitokimia

Ekstrak yang digunakan untuk skrining fitokimia adalah ekstrak n-heksan, dan ekstrak metanol. Skrining fitokimia tidak dilakukan pada semua ekstrak dikarenakan biaya dan waktu yang terbatas. Metode skrining yang digunakan berdasarkan metode Ciulei [5].

Identifikasi Alkaloid

Sampel sebanyak 3 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 mL HCl 2 M, diaduk dan kemudian didinginkan pada temperatur ruangan. Setelah sampel dingin ditambahkan 0,5 g NaCl lalu diaduk dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan HCl 2 M sebanyak 3 tetes, kemudian dipisahkan menjadi 3 bagian A, B, dan C. Filtrat A sebagai blanko, filtrat B ditambah pereaksi Mayer, dan filtrat C ditambah pereaksi Wagner. Apabila terbentuk endapan pada penambahan pereaksi Mayer dan Wagner maka identifikasi menunjukkan adanya alkaloid.

Identifikasi Sterol dan Triterpen

Ekstrak daun gelumpang diuapkan hingga kering, kemudian residu yang dihasilkan dilarutkan dalam kloroform (0,5 mL), lalu ditambah dengan asam asetat anhidrat (0,5 mL). Selanjutnya campuran ini ditetesi dengan H₂SO₄ pekat (12 mL) melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpen, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya sterol.

Identifikasi Kumarin

Ekstrak daun gelumpang diuapkan hingga kering, kemudian dilarutkan dengan air panas, setelah dingin, larutan dibagi dalam 2 tabung reaksi, yaitu tabung 1 sebagai blanko, dan tabung 2 ditambah NH₃ 10% (0,5 mL). Adanya pijaran yang kuat di bawah sinar UV menunjukkan adanya kumarin dan turunannya.

Identifikasi Flavonoid

Ekstrak daun gelumpang diuapkan hingga kering, kemudian dilarutkan dalam metanol panas 50% (12 mL). Setelah itu ditambahkan logam Mg dan HCl pekat (45 tetes). Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

Identifikasi Tannin

Ekstrak daun gelumpang dilarutkan dalam air (12 mL) dan ditambahkan larutan FeCl₃ (2 tetes), timbulnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tannin galat dan jika warnanya hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tannin katekol.

Identifikasi Saponin

Setiap ekstrak kasar dalam tabung reaksi ditambah air (1 : 1) sambil dikocok selama 5 menit. Adanya busa yang dapat bertahan selama 30 menit menunjukkan adanya senyawa saponin. Uji penegasan saponin dilakukan dengan menguapkan sampel sampai kering kemudian mencucinya dengan heksan sampai filtrat jernih. Residu yang tertinggal ditambahkan kloroform, diaduk 5 menit, kemudian ditambahkan Na₂SO₄ anhidrat dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 2 bagian, A dan B. Filtrat A sebagai blanko, filtrat B ditetesi anhidrat asetat, diaduk perlahan, kemudian ditambah H₂SO₄ pekat dan diaduk kembali. Terbentuknya cincin merah sampai coklat menunjukkan adanya saponin

2.3.4 Analisis Kromatografi Kolom dan Kromatografi

Lapis Tipis (KLT)

Analisis KLT dilakukan dengan menggunakan lempeng KLT silika gel G₆₀ F₂₅₄ (Merck) dengan fase gerak berupa campuran beberapa pelarut organik dengan perbandingan tertentu.

2.3.5 Uji Antibakteri Metoda Difusi Sumuran (*disk diffusion assay*)

Setiap ekstrak yang diperoleh diuji bioaktivitasnya terhadap bakteri *S. aureus*. secara *in vitro* [6]. Adapun isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari laboratorium Biomedik RSU Mataram. Prosedurnya sebagai berikut:

Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam DMSO 50 persen. Sebanyak 30 μ l ditetaskan pada sumuran media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dengan konsentrasi 10⁶ sel/mL. Inokulum diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengamatan terhadap

aktivitas penghambatan bakteri dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambat (DDH) yang terbentuk di sekitar sumuran. Semua perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Daya hambat ekstrak uji dievaluasi dengan cara membandingkan DDH kontrol positif dan DDH kontrol negatif.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi Maserasi Sampel

Berat ekstrak kulit batang Gelumpang yang diperoleh dari hasil ekstraksi maserasi 46,47 gram sampel tercantum dalam tabel sebagai berikut :

Tabel 1. Berat Ekstrak Hasil Ekstraksi Maserasi

No	Ekstrak Pelarut	Berat Ekstrak (mg)	Berat ekstrak (ppm=mg/kg)
1	Ekstrak n-heksan	50	1075,96
2	Ekstrak DCM	110	2367,12
3	Ekstrak Metanol	550	11835,59
4	Ekstrak Air	670	14417,90

Pada tabel di atas terlihat bahwa pelarut yang paling banyak menarik ekstrak kulit batang Gelumpang dari hasil ekstraksi maserasi adalah air, selanjutnya diikuti oleh metanol, DCM dan n-heksan. Pelarut air dengan nilai tetapan dielektrik tertinggi yaitu 78 merupakan pelarut organik sangat polar yang dapat melarutkan dengan baik metabolit sekunder yang bersifat polar dibandingkan dengan pelarut organik lainnya seperti metanol, DCM dan n-heksan.

3.2 Penapisan Fitokimia Ekstrak Sampel

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui komponen kimia pada tumbuhan secara kualitatif. Pereaksi-pereaksi spesifik yang digunakan umumnya bersifat polar sehingga bisa berinteraksi dengan sampel berdasarkan prinsip 'like dissolve like'. Hasil skrining fitokimia ekstrak kulit batang Gelumpang dalam beberapa pelarut organik disajikan pada tabel 2 berikut ini:

Tabel 2. Hasil Penapisan Senyawa Kimia Ekstrak Kulit Batang Gelumpang

Ekstrak	Metabolit Sekunder							
	Saponin	Tanin	Alkaloid	M.atsiri	Sterol	Triterpen	Kumarin	Flavonoid
n-heksan	-	-	-	v	v	-	v	-
DCM	-	v	-	v	v	v	-	-
Metanol	-	v	-	v	-	-	-	-
Air	-	-	-	v	-	-	v	v

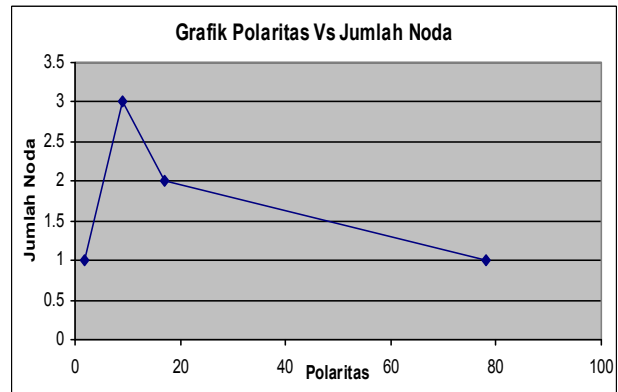
Keterangan : - = tidak terdeteksi ; v = terdeteksi

Dalam penelitian ini, metabolit sekunder yang bersifat polar seperti senyawa fenolik alam (tanin, kumarin, flavonoid) diperkirakan mempunyai persentase yang cukup besar pada ekstrak kulit batang Gelumpang dibandingkan dengan yang bersifat non polar (steroid, triterpen, minyak atsiri)

3.3 Kromatografi Lapis Tipis

Polaritas eluen yang digunakan dalam mengelusi sampel sangat memengaruhi pola pemisahan komponen. Eluen n-heksan:n-propanol:air (16:3:1) bersifat sedikit polar dan sangat sesuai dengan polaritas ekstrak DCM, sehingga komponen-komponen yang ada dapat terpisah cukup baik. Sedangkan pada ekstrak n-heksan yang bersifat non polar dan air yang bersifat sangat polar hanya menghasilkan masing-masing satu noda. Hubungan antara polaritas pelarut dengan jumlah noda yang diperoleh terlihat pada grafik di bawah ini :

Grafik 1. Hubungan Polaritas Pelarut dengan Jumlah Noda yang Terbentuk Menggunakan Eluen n-heksan:n-propanol:air (16:3:1)

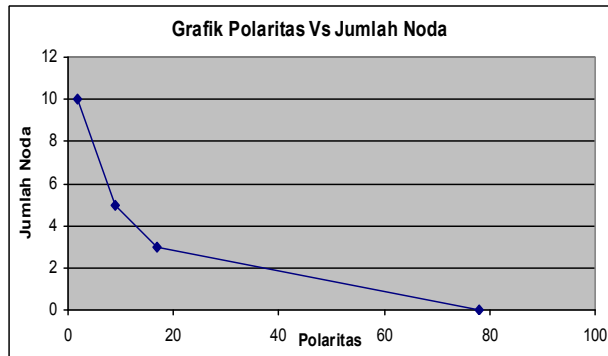


Perpaduan antara n-heksan dan DCM dengan perbandingan 8 dan 12 sebagai eluen dapat memisahkan komponen senyawa pada ekstrak n-heksan, DCM dan metanol paling baik dibandingkan dengan eluen-eluen sebelumnya. Tingkat polaritas eluen yang digunakan sesuai dengan polaritas ekstrak-ekstrak tersebut.

Jumlah komponen/noda yang dapat dipisahkan menggunakan eluen ini meningkat kecuali pada ekstrak air (gambar 3). Rentang Rf untuk setiap ekstrak terlihat juga lebih baik dengan menggunakan eluen ini, yang berarti semua komponen baik yang bersifat non polar dan polar telah dapat dipisahkan dengan maksimal. Sebagai contoh, pada ekstrak n-heksan terdapat 10 noda dengan menggunakan n-heksan:DCM (8:12) sebagai eluen dan

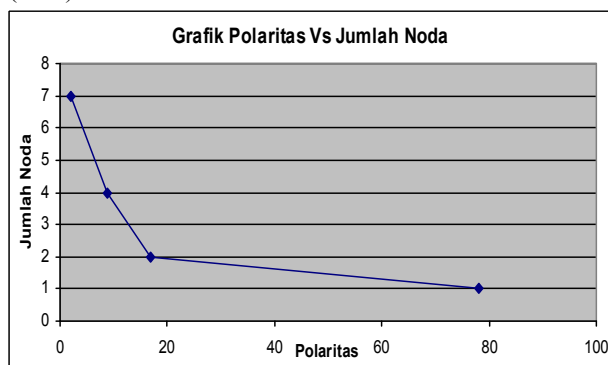
mempunyai Rf berkisar 0,02-0,96, sementara dengan n-heksan:DCM (12:8) nilai Rf berkisar 0,11-0,96 (7 noda) dan dengan n-heksan:n-propanol:air (16:3:1) mempunyai 1 noda dengan Rf = 0,92.

Grafik2. Hubungan Polaritas Pelarut dengan Jumlah Noda yang Terbentuk Menggunakan Eluen n-heksan:DCM (8:12)



Campuran pelarut n-heksan dan DCM dengan perbandingan 12 dan 8 merupakan eluen yang bersifat non polar, sehingga komponen yang bersifat lebih polar pada semua ekstrak belum terpisah dengan baik. Namun pemisahan komponen pada semua ekstrak menggunakan eluen ini masih lebih baik dibandingkan dengan eluen sebelumnya. Hal ini terlihat adanya peningkatan jumlah noda yang terbentuk pada ekstrak n-heksan dan DCM. Adapun hubungan antara polaritas pelarut dengan jumlah noda yang diperoleh terlihat pada grafik di bawah ini :

Grafik 3. Hubungan Polaritas Pelarut dengan Jumlah Noda yang Terbentuk Menggunakan Eluen n-heksan:DCM (12:8)



3.4. Analisis Bioassay

Sifat antibakteri dari ekstrak kulit batang Gelumpang yang diperoleh dengan menggunakan berbagai macam pelarut dan dinyatakan dalam diameter daya hambat (DDH) terhadap bakteri uji dapat dilihat pada tabel 3 berikut ini :

Tabel 3. Sifat antibakteri bahan terekstrak dari kulit batang Gelumpang yang diekstraksi dengan maserasi menggunakan berbagai jenis pelarut berbeda

Perlakuan	Rata-rata Diameter Daya Hambat (DDH,mm) <i>S. aureus</i>
Kontrol negatif (Tetrasiklin)	43,0
Ekstrak n-heksan	2,4
Ekstrak DCM	4,6
Ekstrak Metanol	7,4
Ekstrak Air	1,7
Kontrol Positif (DMSO)	0,0

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang Gelumpang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Hal ini diduga karena adanya kandungan senyawa kimia seperti flavonoid, kumarin, tanin, triterpenoid, steroid, dan minyak atsiri di dalam ekstrak tersebut. Senyawa-senyawa itulah yang berperan sebagai bahan aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Pertumbuhan bakteri yang terhambat atau kematian bakteri akibat suatu zat antibakteri dapat disebabkan oleh penghambatan terhadap sintesis dinding sel, penghambatan terhadap fungsi membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein, atau penghambatan terhadap sintesis asam nukleat [7].

Di antara berbagai kerusakan yang dapat terjadi pada sel bakteri tersebut, yang mungkin terjadi pada bakteri *S. aureus* akibat pemberian ekstrak adalah penghambatan terhadap sintesis dinding sel. Ini didasarkan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak air (DDH = 1,7 mm) yang merupakan senyawa fenol yang dapat bersifat koagulator protein [8]. Protein yang menggumpal tidak dapat berfungsi lagi, sehingga akan mengganggu pembentukan dinding sel bakteri

Dari tabel 3 terlihat DDH ekstrak metanol paling luas (7,4 mm) kemudian diikuti oleh ekstrak DCM (4,6 mm), hal ini diperkirakan karena pengaruh adanya senyawa tanin pada kedua ekstrak tersebut. Tanin diduga mempunyai mekanisme yang sama dengan senyawa fenolik lainnya dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri. Adapun mekanismenya, senyawa tanin dapat bereaksi dengan cara : (a) bereaksi dengan sel membran, (b) inaktivasi enzim-enzim esensial dan (c) destruksi atau inaktivasi fungsi dari material genetik [9].

Kemampuan kulit batang menghambat pertumbuhan bakteri juga dipengaruhi oleh sifat dinding sel yang dimiliki bakteri uji. Bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif mempunyai dinding sel yang berbeda sensitivitasnya terhadap perlakuan fisik, enzim dan antibiotik [10].

Struktur dinding sel bakteri Gram positif relatif lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja [11]. Pada *S. aureus* pemberian senyawa antibakteri dapat menghambat perakitan dinding sel dan mengakibatkan penggabungan rantai glikan tidak terhubung silang ke dalam peptidoglikan dinding sel menuju suatu struktur yang lemah dan menyebabkan kematian bakteri [12].

Tanpa dinding sel, bakteri tidak dapat bertahan terhadap pengaruh luar dan segera mati [13]. Oleh karena itu, diduga adanya gangguan atau penghambatan pada perakitan dinding sel utuh yang tepat serta lisisnya dinding sel dapat menerangkan efek menghambat/bakteriostatik dari ekstrak kulit batang Gelumpang..

IV. KESIMPULAN

Ekstrak kulit batang Gelumpang (*Sterculia foetida* L) diperkirakan mengandung senyawa tanin, minyak atsiri, sterol, triterpen, kumarin dan flavonoid berdasarkan hasil penapisan fitokimia. Komponen-komponen kimia yang ada pada ekstrak dapat dipisahkan

dengan baik menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan eluen n-heksan:DCM (8:12) dan plat KLT silika gel G₆₀ F₂₅₄ (Merck).

Hasil penelitian ini juga memberikan data empiris yang menginformasikan adanya daya antibakteri pada ekstrak kulit batang Gelumpang, khususnya terhadap *S. aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Pharmacy Business. 2007. *Pasar Biofarmaka*, (Online), (<http://bisnisfarmasi.wordpress.com/2007/02>, diakses 15 Juni 2007)
- [2] Schmidt,R.J. 2004. *Sterculiaceae*. (Online). (<http://BoDD.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDerms/STER.html>, diakses 27 Desember 2005).
- [3] Perry,L.M., and J.Metzger, 1980. *Medicinal Plants Of East and Southeast Asia*. The MIT press Cambridge, Massachusetts and London. 620h.
- [4] Miller dan Neuzil, 1980. *Modern Experimental Organic Chemistry*, D.C.Heath and Company, Lexington, Massachusetts, Toronto.
- [5] Ciulei J, 1984. *Metodologi for Analisis of Vegetables and Drugs*. Faculty of Pharmacy, Bucharest Rumania, 11?26.
- [6] Hamilton-Miller, J.M.T. and S. Shah, 2000. Activity of the tea component epicatechin gallate and analogue against methicillin-resistan *Staphylococcus aureus*. *J. of Antimicrob. Chem.* 46:847-863.
- [7] Jawetz,E., J.Melnik and E. Adeloery. 1993. *Mikrobiologi untuk Profesi kesehatan*. Terjemahan Tonang H. EGC. Penerbit BukuKedokteran,Jakarta. 165 – 173.
- [8] Dwidjoseputro D. 1994. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan, Jakarta
- [9] Brannen, L.A, P.M. Davidson. 1993. *Antimicrobials in Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [10] Fardiaz, S.1983. *Keamanan Pangan Jilid 1*. Jurusan TPG. Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor.
- [11] Pelczar, M.J. and E.C.S. Chan.1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi I*. Penerjemah : R.S. Hadioetomo, T.Imas SS Tjitrosomo, S.L.Agka. UI press, Jakarta.
- [12] Morin RB and Gorman M. 1995. *Kimia dan Biologi Antibiotik b-Lactam (Chemistry and Biology of b-Lactam Antibiotics)*. Edisi III. Diterjemahkan oleh Mulyani S. IKIP Semarang Press, Semarang.
- [13] Wattimena JR, Sugiarso NC, Widiyanto MB, Sukandar EY, Soemardji AA, Setiadi AR. 1991. *Farmakologi dan Terapi Antibiotik*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta