

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL BIJI GANITRI (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI PENYEBAB DISENTRI BASILER SECARA *IN VITRO***

**Sunawan, Tristi Indah Dwi Kurnia, Hasyim As'ari**

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas PGRI Banyuwangi

Email: sunawanwawan377@yahoo.co.id

**ABSTRAK**

Disentri basiler adalah salah satu jenis penyakit diare akut yang disebabkan oleh bakteri *Shigella dysenteriae*. Kasus resistensi *Shigella dysenteriae* terhadap beberapa antibiotik telah banyak ditemukan. Oleh karena itu, perlu dikembangkan pengobatan alternatif dengan menggunakan bahan-bahan alami yang diharapkan lebih efektif, efisien, dan aman. Biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) adalah salah satu alternatif bahan alami yang mengandung senyawa antibakteri yang mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, glikosida, steroid, alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) Terhadap pertumbuhan bakteri yang menyebabkan disentri basiler secara *in vitro* dengan metode sumur dengan kontrol positif tetrasiklin 1% dan kontrol negatif aquades steril. Pengujian pengaruh ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) terhadap pertumbuhan bakteri penyebab disentri basiler, menggunakan serial konsentrasi ekstrak etanol biji ganitri 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%, serta menggunakan konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5% dan 10% untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM). Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa nilai signifikansi 0,000 ( $P < 0,05$ ), karena nilai  $P < 0,05$  maka dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan dari masing-masing konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Hasil uji Duncan menunjukkan ekstrak etanol ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) pada konsentrasi 50% memiliki zona hambat yang berbeda nyata atau berbeda nyata pada perlakuan perlakuan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% kontrol negatif, dan positif kontrol. KHM ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) pada konsentrasi 1%.

**Kata kunci:** Biji ganitri, serial konsentrasi, disentri basiler, *Shigella dysenteriae*, KHM.

**ABSTRACT**

Bacillary dysentery is one type of acute diarrheal disease caused by the bacterium *Shigella dysenteriae*. *Shigella dysenteriae* cases of resistance to some antibiotics have been widely found. Therefore, it is necessary to develop alternative treatments using natural ingredients that are expected to be more effective, efficient, and safe. Seeds ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) Is one alternative natural ingredients that contain antibacterial compounds that contain secondary metabolites such as flavonoids, glycosides, steroids, alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. This research aimed to determine the effect of ethanol extracts of seeds ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) On the growth of bacteria that cause bacillary dysentery *in vitro* by the method of the wells with positive control tetracycline 1% and negative controls sterile distilled water. In the test the effect of ethanol extract of seeds ganitri

(*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) On the growth of bacteria that cause bacillary dysentery, serial concentrations of ethanol extract ganitri seeds used 10%, 20%, 30%, 40% and 50%, then in the test Inhibitory Concentration minimum (MIC) using a concentration of 1%, 2.5%, 5%, 7.5% and 10%. ANOVA test results showed that the significance value of 0.000 ( $P < 0.05$ ), as the value of  $P < 0.05$  it can be concluded that there is significant different from each kosenterasi against the growth of bacteria *Shigella dysenteriae*. Duncan test results showed grain ethanol extract ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) At a concentration of 50% have a significantly different inhibitory zone or differ significantly on the treatment concentration of 10%, 20%, 30%, 40% negative control, and positive control. KHM ganitri seed ethanol extract (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) At a concentration of 1% extract.

**Keywords:** Seeds ganitri, Serial concentration, bacillary dysentery, *Shigella dysenteriae*, MIC.

## **1. PENDAHULUAN**

Diare merupakan masalah terbesar di Indonesia, dilaporkan 60 juta pasien per tahun 70-80% terjangkau diare, khususnya anak berusia di bawah 5 tahun, Ghiskan melaporkan 5 juta kematian pasien diare di dunia setiap tahunnya. *World Health Organization* membagi diare menjadi tiga kelompok yaitu diare cair akut, diare berdarah (disentri) dan diare persisten. Diare berdarah dapat disebabkan disentri basiler (*Shigella*) dan amoeba, enterokolitis (misalnya *crows milk allergy*), trichuriasis, EIEC (*Compylobacter jejuni* dan virus (*rotavirus*). Penyebab yang paling umum mengakibatkan tingginya jumlah diare adalah disentri basiler (DepKes, 2007).

Disentri basiler merupakan sakit perut yang sering disertai dengan tenesmus, berak-berak, dan tinja mengandung darah dan lender. Adanya darah dan leukosit dalam tinja merupakan suatu bukti bahwa kuman penyebab disentri tersebut menembus dinding kolon dan berkoloni dibawahnya (Jawetz, 2001).

Penyebab utama disentri basiler adalah bakteri *Shigella dysenteriae* yang merupakan bakteri gram negatif, *nonmotile*, berbentuk batang, berukuran 0,5– 0,7  $\mu\text{m}$  x 2,3  $\mu\text{m}$  dan tidak berflagel. *Shigella dysenteriae* dapat menyebabkan *Shigellosis* (disentri basiler) dengan cara menginvasi epitel usus besar. Bakteri *Shigella dysenteriae* mampu menyerang dan memecah sel-sel epitel serta makrofag dan sel dendritik kemudian masuk ke sitosol (Lucchini dkk.2005).

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Shigella dysenteriae* dapat disembuhkan dengan menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik yang berlebihan menyebabkan bakteri *resisten*. Salah satu pengobatan alternatif salah dengan

memanfaatkan senyawa metabolit sekunder tumbuhan. Tanaman yang berpotensi sebagai obat alami serta dimanfaatkan sebagai alternatif antibakteri adalah biji tanaman ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) (Hanson, 2008).

Biji tanaman ganitri umumnya masyarakat dimanfaatkan sebagai manik-manik, mala atau tasbih yang dipercaya oleh umat Hindu sebagai alat meditasi dan berdo'a. Selain itu biji tanaman ganitri memiliki zat antibakteri yang mempengaruhi metabolisme mikroorganisme (Kamal, 2010). Penelitian yang dilakukan (Robinson, 2009) menyatakan, bahwa ekstraksi bertahap pada biji ganitri dengan pelarut etil asetat, petroleum eter, dan etanol 70% menunjukkan bahwa pada biji ganitri mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan glikosida. Salah satu yang berperan sebagai antibakteri adalah senyawa glikosida.

Penelitian sebelumnya ekstrak biji ganitri memiliki daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* dan *Escheria coli* sehingga membuktikan bahwa biji ganitri memiliki sifat antibakteri karena mengandung senyawa aktif (Sigh dkk, 2012). Poelongan (2005) menyatakan, mekanisme penghambatan bakteri oleh senyawa polifenol, alkaloid, saponin dan glikosida secara umum ialah dengan cara menghambat dan merusak pembentukan dinding sel sehingga akan memudahkan senyawa lain berinteraksi dengan komponen penyusun sel lain dari bakteri umum ialah dengan cara merusak komponen penyusun peptidoglikan pada bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh. Kerusakan dinding sel menyebabkan permeabilitas membran sel akan berubah sehingga menghambat kerja enzim intraseluler dan menyebabkan masuknya air secara tidak terkontrol ke dalam sel bakteri yang pada akhirnya mengakibatkan kematian.

Berdasarkan uraian latar belakang diatas maka tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) terhadap pertumbuhan bakteri penyebab disentri basiler secara *in vitro*.

## **2. METODE PENELITIAN**

### *2.1 Rancangan Penelitian*

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Penyebab Disentri Basiler Secara *In vitro* dengan menggunakan metode difusi atau metode lubang (sumuran). Setiap sumuran diisi serial konsentrasi ekstrak etanol biji ganitri yang bertujuan untuk mengetahui Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Penyebab Disentri Basiler. Serial konsentrasi yang digunakan sebesar: 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Setelah didapatkan pengaruh antimikrobal dari ekstrak etanol biji ganitri dari uji sebelumnya, selanjutnya dilakukan pengenceran untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM), konsentrasi yang digunakan sebesar: 1%, 2.5%, 5%, 7.5%, dan 10%. Kontrol positif menggunakan tetrasiklin 1% dan kontrol negatif aquades steril.

Penelitian dilakukan dengan cara mengambil 100 µl suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* dari biakan murni yang berumur 24 jam, kemudian dituang ke dalam tabung reaksi yang berisi medium agar yang masih cair dan divortek. membuat lubang atau sumuran pada permukaan medium agar sebanyak 7 buah dengan menggunakan pencetak agar yang sudah disterilkan dengan diameter 0,5 cm. Isi tiap lubang sumuran dengan serial konsentrasi ekstrak etanol biji ganitri dengan volume sebanyak 40 µl. Kemudian inkubasi pada suhu  $\pm 31^{\circ}\text{C}$  dan selama 24 jam.

Penentuan zona hambat ekstrak etanol biji ganitri berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk disekitar sumuran yang diukur dengan menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Diameter hambatan} = d2 - d1$$

Keterangan : d1 : diameter sumuran

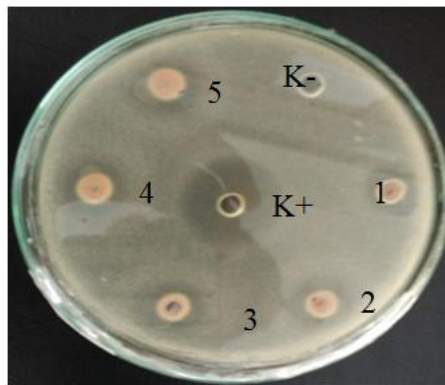
d2 : diameter zona bening disekitar sumuran

*2.2 Analisis Data*

Data dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji Anova pada tingkat kepercayaan 95%, dilanjutkan dengan uji Duncan untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan. Analisis ststistik yang digunakan adalah SPSS versi 17.

**3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

Tanaman ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) merupakan salah satu tanaman obat yang dapat berpotensi sebagai obat antibakteri. Hasil penelitian yang dilakukan oleh (Harbone, 2002) menunjukkan bahwa biji ganitri mempunyai kandungan metabolit sekunder seperti glikosida, steroid, alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin. Kombinasi metabolit sekunder tersebut dapat menjadi antibakteri. Hasil penelitian dapat dilihat pada Gambar dan Tabel yang akan diuraikan berikut ini.



Gambar 1. Zona Hambat Ekstrak Etanol Biji Ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) terhadap Pertumbuhan Bakteri Penyebab Disentri Basiler.

Keterangan:

- 1 = ekstrak biji ganitri 10%
- 2 = ekstrak biji ganitri 20%
- 3 = ekstrak biji ganitri 30%
- 4 = ekstrak biji ganitri 40%
- 5 = ekstrak biji ganitri 50%
- K- = aquades steril
- K+ = tetrasiklin 1%

Tabel 1. Hasil Pengukuran Zona Hambat Ekstrak Etanol Biji Ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) terhadap Pertumbuhan Bakteri penyebab Disentri Basiler.

No.	Perlakuan	U1 (cm)	U2 (cm)	U3 (cm)	Rata-rata Diameter Zona Hambat (cm)
1	10%	0.12	0.25	0.15	0.173
2	20%	0.39	0.43	0.41	0.410
3	30%	0.51	0.52	0.42	0.483
4	40%	0.59	0.57	0.65	0.603
5	50%	1.16	0.83	1.04	1.010
6	K+	1.87	1.65	1.75	1.760
7	K-	0.00	0.00	0.00	0.000

Keterangan: K+ = Kontrol positif tetrasiklin 1%  
 K- = Kontrol Negatif aquades steril  
 U1 = Hasil pengukuran diameter zona hambat ulangan 1  
 U2 = Hasil pengukuran diameter zona hambat ulangan 2  
 U3 = Hasil pengukuran diameter zona hambat ulangan 3

Berdasarkan Tabel (1) hasil penelitian pengaruh ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) pada semua kosentrasi terbentuk zona bening yang merupakan zona hambatan ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.). Dimana zona hambatan terbesar ditunjukkan pada kosentrasi 50% dengan rata-rata diameter zona hambatan sebesar 1.010 cm, sedangkan zona hambatan terkecil ditunjukkan pada kosentrasi 10% yaitu dengan rata-rata diameter zona hambatan 0.173 cm. Pada kontrol positif (Tetrasiklin 1%) terbentuk zona hambatan sebesar 1.760 cm, sedangkan pada kontrol negatif (Aquades steril) tidak terbentuk zona hambatan. Berdasarkan data diatas, zona

hambat ekstrak etanol biji ganitri terhadap pertumbuhan bakteri penyebab Disentri Basiler memiliki ukuran yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kosentrasi perlakuan ekstrak etanol biji ganitri sebanding dengan zat antimikrobal yang ada di dalamnya, sehingga menyebabkan zona hambat yang semakin besar pada tingkat kosentrasi ekstrak yang lebih tinggi. Menurut Volk dan Wheeler (1993) serta Pelczar *et al.* (2008), semakin tinggi kosentrasi zat antimikrobal maka semakin besar pula zona hambat yang terbentuk.

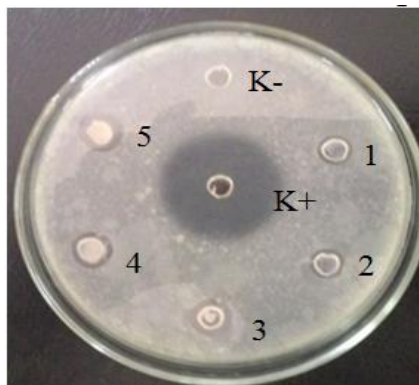
Berdasarkan uji ANOVA menunjukkan bahwa nilai (F.Hit > F. Tabel) dengan F.Hit sebesar 146,771 dan F.Tabel 2,85, serta didapatkan nilai signifikansi sebesar

0,000, karena nilai signifikasinya lebih kecil dari 0,05 ( $P < 0,05$ ), maka dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) terhadap pertumbuhan bakteri penyebab disentri basiler (*Shigella dysenteriae*). Selanjutnya analisis dilakukan dengan uji *Duncan* untuk membandingkan dari setiap perlakuan. Pada uji *Duncan*, konsentrasi perlakuan 10% dan 20% berada dalam kolom yang berbeda, hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi perlakuan 10% dan 20% memiliki zona hambat yang tidak berbeda nyata atau berbeda signifikan. Pada konsentrasi perlakuan 20% dan 30% berada pada kolom yang sama, hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi perlakuan 20% dan 30% memiliki zona hambat yang tidak berbeda nyata atau tidak signifikan, dengan nilai signifikansi sebesar 0,305, begitu juga pada konsentrasi perlakuan 30% dan 40% berada pada kolom yang sama, hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi perlakuan 30% dan 40% memiliki zona hambat yang tidak berbeda nyata atau tidak signifikan, dengan nilai signifikansi sebesar 0,103. Sedangkan pada konsentrasi perlakuan 50% mempunyai zona hambat yang berbeda nyata atau signifikan terhadap konsentrasi perlakuan 10%, 20%, 30%, 40% kontrol negatif, dan kontrol positif.

Terbentuknya zona hambat pada pertumbuhan bakteri penyebab disentri basiler dapat terjadi karena adanya aktivitas dari kandungan senyawa flavonoid, glikosida, steroid, alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin yang terdapat dalam biji ganitri. Senyawa flavanoid yang terdapat pada biji ganitri menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dan DNA bakteri. Flavonoid juga, memiliki sifat lipofilik sehingga memungkinkan untuk merusak membran sel bakteri. Kandungan senyawa alkaloid dapat menghambat kerja enzim pada sintesis protein bakteri. Penghambatan kerja enzim ini dapat mengakibatkan metabolisme bakteri terganggu. Alkaloid juga dapat merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan bakteri mati (Gunawan, 2009).

Kandungan senyawa metabolit sekunder saponin pada biji ganitri dapat berinteraksi dengan sel bakteri dan mempengaruhi permeabilitas dinding sel bakteri, sehingga memungkinkan dinding sel bakteri menjadi lisis atau pecah (Pratiwi, 2008). Demikian pula dengan kandungan senyawa tanin pada biji ganitri yang merupakan senyawa metabolit sekunder yang dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengkoagulasi protoplasma bakteri (Pratiwi, 2008). Kandungan glikosida pada ekstrak biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) juga berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri penyebab disentri basiler dengan cara berpenetrasi ke dalam dinding sel dan merusak komponen dinding sel bakteri (Mubarrak, 2011).

Kandungan senyawa steroid pada biji ganitri terikat dalam bentuk glikosida dimana unit steroid terikat pada suatu gula. Mekanisme kerja antibakteri senyawa steroid yaitu dengan cara menghambat fungsi membran sel dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler sehingga dapat merusak membran sel dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Calvalieri, 2005).



Gambar 2. Hambat Ekstrak Etanol Biji Ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) Pada Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

Keterangan:

- 1 = ekstrak biji ganitri 1%
- 2 = ekstrak biji ganitri 2.5%
- 3 = ekstrak biji ganitri 5%
- 4 = ekstrak biji ganitri 7.5%
- 5 = ekstrak biji ganitri 10%
- K- = aquades steril
- K+ = tetrasiklin 1%



Tabel 2. Hasil Pengukuran Zona Hambat Ekstrak Etanol Biji Ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) pada Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

No.	Perlakuan	U1 (cm)	U2 (cm)	U3 (cm)	Rata-rata Diameter Zona Hambat (cm)
1	1%	0.02	0.02	0.03	0.023
2	2,5%	0.03	0.04	0.04	0.036
3	5%	0.19	0.11	0.12	0.140
4	7,5%	0.16	0.20	0.21	0.190
5	10%	0.23	0.31	0.29	0.280
6	K+	2.12	1.46	1.39	1.660
7	K-	0.00	0.00	0.00	0.000

Keterangan: K+ = Kontrol positif tetrasiklin 1%  
 K- = Kontrol Negatif aquades steril  
 U1 = Hasil pengukuran diameter zona hambat ulangan 1  
 U2 = Hasil pengukuran diameter zona hambat ulangan 2  
 U3 = Hasil pengukuran diameter zona hambat ulangan 3

Berdasarkan hasil uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) dengan menggunakan serial konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10%, dapat diketahui bahwa rerata diameter zona hambat terbesar terbentuk pada kosentrasi ekstrak etanol biji ganitri 10% yaitu 0.280 cm sedangkan rata-rata diameter zona hambat terkecil pada kosentrasi 1% yaitu sebesar 0.023 cm. Berdasarkan hasil uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri penyebab disentri basiler yaitu pada konsentrasi 1% dengan terbentuk zona bening disekitar sumuran.

#### **4. KESIMPULAN DAN SARAN**

##### *4.1 Kesimpulan*

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa Ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) memiliki pengaruh dalam menghambat pertumbuhan bakteri penyebab disentri basiler secara *in vitro*, dengan zona hambat terbesar ditunjukkan oleh konsentrasi 50% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 1.010 cm, sedangkan zona hambat

terkecil ditunjukkan pada konsentrasi 10% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 0.173 cm, dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol biji ganitri (*Elaeocarpus sphaericus* Schum.) ialah sebesar 1%, dimana konsentrasi tersebut masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri penyebab disentri basiler dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 0.023 cm.

#### 4.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada konsentrasi dibawah 1%.

### 5. REFERENSI

- Calvalieri, S.J. 2005. *Manual Of Antimicrobial Susceptibility Testiny*. American Society For Microbiology, USA.
- Depkes. 2007. *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta: Depertemen Republik Indonesia.
- Gunawan, I. W. A. 2009. *Potensi Biji Ganitri (Elaeocarpus sphaericus Schum.) Sebagai Antibakteri Salmonella typhimurium*. Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Mahasaraswati Denpasar.
- Harbone, B.J. 2002. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah Kosasih, P, dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- Hanson, J.R. 2008. *The chemistry of bakteri*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 1-221.
- Jawetz, E, Joseph, M, Edwart, A, A, Geo, F,B, Janet, S,B dan Nicolas, L, O. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 1*. Penerjemah: Mudihardi, E, Kuntaman, Wasito, E, B, Mertamiasih, Harsono, S, Alimsardjono, L. Jakarta: Penerbit Salemba Medika.
- Kamal, N. 2010. *The Power Of Rudraksha*. Mumbai: DK Agencies (P) LTD. www.Incometaxindia. Gow.in [ diakses 19 Agustus 2016 ]
- Lucchini S, Liu H, Jin Q, Hinton JCD, Yu J, 2005. Transcriptional Adaptation of *Shigella flexneri* during Infection of Macrophages and Epithelial Cells: Insights into the Strategies of a Cytosolic Bacterial Pathogen. *Journal of Infection and Immunity*. 73(1): 88-102.
- Poeloengan M, Susan MN, Andriani. 2005. Efektivitas Ekstrak Biji Tumbuhan

Terhadap Mastitis Subklinis. *Journal Online*. Bogor: Balai Penelitian Veteran. 2(5): 354- 361

Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Airlangga.

Robinson, T. 2009. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.

Sigh, Balbir dkk. 2012. *Antianxiety Investigations of Centaurea behen and Elaeocarpus ganitrus* Schum. Amritsar : Departement of pharmaceutical Sciences, Guru Nanak Dev University. [www. Jproline.info](http://www.jproline.info). [diakses 5 Februari 2012].

Volk, W. A. dan Wheeler, M. F. 1993. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Erlangga.