

Uji Daya Hambat Ekstrak Spons Laut (*Callyspongia Aerizusa*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella Typhi* dan *Streptococcus Pyogenes*

¹Yuki B. J. Rumampuk

²Pemsi M. Wowor

²Christi D. Mambo

¹Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

²Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi

Email: 14011101021yukirumampuk@gmail.com

Abstract: Indonesia has the greatest marine biodiversity due to its coral reef ecosystem. *Callyspongia aerizusa* is a type of sponges that has bioactive potential as antibacterial, anticancer, and antifungal that has not been widely used. This study was aimed to determine whether sea sponge *Callyspongia aerizusa* had inhibitory activity against *Salmonella typhi* and *Streptococcus pyogenes*. This was an experimental laboratory study with Kirby-Bauer well method. Two types of bacteria were used and each of them was repeated 3 times. The first well formed on the agar medium in 6 Petri dishes was filled with concentrated extract of sea sponge. The second well was filled with ciprofloxacin as the positive control. The third well was filled with aquadest as the negative control. The results showed that the total inhibitory zone diameter of *Callyspongia aerizusa* extract to *Salmonella typhi* was 12 mm (mean of 4 mm) and to *Streptococcus pyogenes* the total inhibitory zone diameter was 18 mm (mean of 6 mm). **Conclusion:** Sea sponge extract of *Callyspongia aerizusa* could inhibit the growth of *Salmonella typhi* and *Streptococcus pyogenes* but were categorized as weak and moderate respectively. Moreover, their inhibitory activities were weaker than the antibiotic cyprofloxacin.

Keywords: inhibition, Kirby-Bauer, sea sponges *Callyspongia aerizusa*

Abstrak: Indonesia memiliki keanekaragaman hayati laut terbesar karena memiliki ekosistem terumbu karang. *Callyspongia aerizusa* merupakan salah satu jenis spons yang berpotensi bioaktif sebagai antibakteri, antikanker, antijamur yang belum banyak dimanfaatkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya daya hambat spons laut *Callyspongia aerizusa* terhadap *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*. Jenis penelitian ialah eksperimental dengan metode sumuran Kirby-Bauer. Pada penelitian ini digunakan 2 jenis bakteri dan tiap bakteri dilakukan pengulangan 3 kali. Sumur pertama yang sudah terbentuk pada media agar di 6 cawan Petri diisi dengan larutan ekstrak pekat spons laut *Callyspongia aerizusa*. Sumur kedua diisi dengan kontrol positif yaitu siprofloksasin. Sumur ketiga diisi dengan kontrol negatif yaitu akuades. Hasil penelitian memperlihatkan diameter zona hambat total dari ekstrak *Callyspongia aerizusa* terhadap *Salmonella typhi* sebesar 12 mm (rerata 4 mm) dan terhadap *Streptococcus pyogenes* diameter zona hambat total sebesar 18 mm (rerata 6 mm). **Simpulan:** Ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*, namun masih dikategorikan lemah dan sedang, juga masih lebih lemah dibandingkan dengan obat antimikroba siprofloksasin.

Kata kunci: daya hambat, Kirby-Bauer, spons laut *Callyspongia aerizusa*

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati (biodiver-

sitas) laut terbesar di dunia, karena memiliki ekosistem pesisir yang khas, salah satunya

yaitu ekosistem terumbu karang (*coral reefs*). Jenis biota laut di daerah tropis Indonesia diperkirakan 2-3 kali lebih besar dibandingkan dengan biota laut di daerah subtropik dan di daerah beriklim dingin.¹⁻³

Spons atau porifera adalah hewan dari phylum porifera yang merupakan salah satu penyusun pada ekosistem pesisir dan laut, terutama pada ekosistem terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif sebagai anti-bakteri, antikanker, antijamur yang belum banyak dimanfaatkan. Sebanyak 850 sampai 1500 spesies spons terdapat di perairan Indonesia.⁴⁻¹¹ Penelitian yang dilakukan oleh Krisyuninda¹⁰ pada tahun 2012 tentang isolasi senyawa bioaktif spons *Callyspongia* sp. dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) mendapatkan bahwa pada spons tersebut terdapat kandungan steroid, alkaloid, flavonoid dan treponoid. Hasil penelitian tersebut didukung oleh hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Cowan¹¹ pada tahun 1999 yang menyatakan bahwa dalam ekstrak spons laut *Callyspongia* sp. terdapat senyawa steroid, alkaloid, flavonoid, dan antraquinon.

Salmonella typhi adalah salah satu bakteri Gram negatif yang merupakan kuman patogen penyebab demam tifoid, yaitu suatu penyakit infeksi sistemik bersifat akut, ditularkan melalui jalur fekal-oral terutama melalui makanan dan air yang terkontaminasi. Gejala tidak spesifik dan biasanya demam, anoreksia, sakit kepala, mialgia, dan konstipasi. Demam tifoid didahului oleh gastroenteritis, yang biasanya sembuh sebelum timbulnya penyakit sistemik.¹²⁻¹⁴

Streptococcus pyogenes adalah bakteri Gram positif yang merupakan salah satu patogen yang banyak menginfeksi manusia. Penyakit yang berhubungan dengan *Streptococcus* terjadi terutama pada saluran pernapasan (faringitis atau tonsilitis) atau infeksi kulit (pyoderma).^{15,16}

Penelitian oleh Warbung et al.³ pada tahun 2013 melaporkan bahwa ekstrak spons laut *Callyspongia* sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini bertujuan

untuk menguji apakah ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini ialah eksperimental labortorik di Laboratorium Analisa Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sam Ratulangi Manado.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, wadah, pinset, oven, inkubator, api bunsen, jarum ose, jangka sorong, timbangan, tabung *erlenmeyer*, *vacuum rotary evaporator*, *autoclave*, *laminar air flow*, gunting, spidol, kamera, masker dan sarung tangan.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: spons laut *Callyspongia aerizusa*, bakteri *Salmonella Typhi*, bakteri *Streptococcus pyogenes*, NA (*Nutrient Agar*), NaCl 0,9%, MHA (*Mueller Hinton Agar*), akuades, siprofloksasin, larutan BaCl₂ 1%, larutan H₂SO₄ 1% dan akuades.

Pembuatan ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* dilakukan menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% selama 24 jam dengan perbandingan 1:2 (w/v). Bagian sisa dari penguapan etanol disebut ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang dihasilkan sebanyak 5,3 gram.

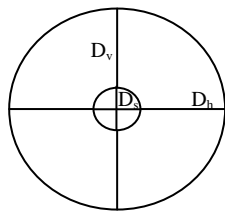
Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan dalam oven pada suhu 170°C selama ± 1 jam (sterilisasi kering). Media disterilkan dalam *autoclave* sampai suhu mencapai 121°C dan tunggu selama 15 menit (sterilisasi basah).

Inokulasi bakteri pada media agar miring. Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji. Standar kekeruhan suspensi bakteri uji menggunakan larutan baku McFarland.

Metode pengujian yang digunakan ialah metode modifikasi Kirby-Bauer dengan menggunakan sumuran. Sumur

pertama yang sudah terbentuk pada media agar di 6 cawan petri diisi dengan larutan ekstrak pekat spons laut *Callyspongia aerizusa* yang sudah dilarutkan dengan etanol 96% dan dievaporasi dengan *vacuum rotary evaporator*. Sumur kedua diisi dengan kontrol positif yaitu siprofloksasin yang sudah dilarutkan dengan akuades. Sumur ketiga yang merupakan kontrol negatif diisi dengan akuades. Masing-masing ditetaskan pada sumur yang berbeda sebanyak 0,2 ml. Setelah itu, cawan Petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam. Zona bening merupakan petunjuk adanya daya hambat dari ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*. Zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur diukur diameter vertikal dan diameter horizontal dengan satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong (Gambar 1).



Gambar 1. Pengukuran diameter zona hambat

Keterangan :

D_v : Diameter vertikal

D_h : Diameter horizontal

D_s : Diameter sumur

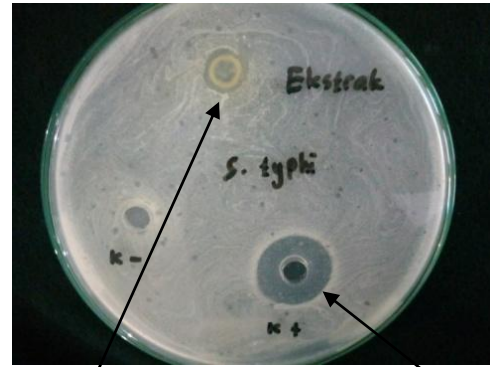
Diameter zona hambat diukur dengan rumus :

$$\left(\frac{D_v + D_h}{2} \right) - 7$$

HASIL PENELITIAN

Salmonella typhi

Zona hambat yang terbentuk pada media perlakuan bakteri *Salmonella typhi* dapat dilihat pada Gambar 2. Zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur yang diberi kontrol positif (siprofloksasin) lebih besar daripada zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur yang diberi ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa*.



Zona hambat ekstrak spons laut

Zona hambat kontrol positif

Gambar 2. Zona hambat yang terbentuk terhadap bakteri *Salmonella typhi*

Perbandingan diameter zona hambat kontrol negatif (akuades), kontrol positif (siprofloksasin), dan ekstrak spons laut terhadap bakteri *Salmonella typhi* dapat dilihat pada Tabel 1.

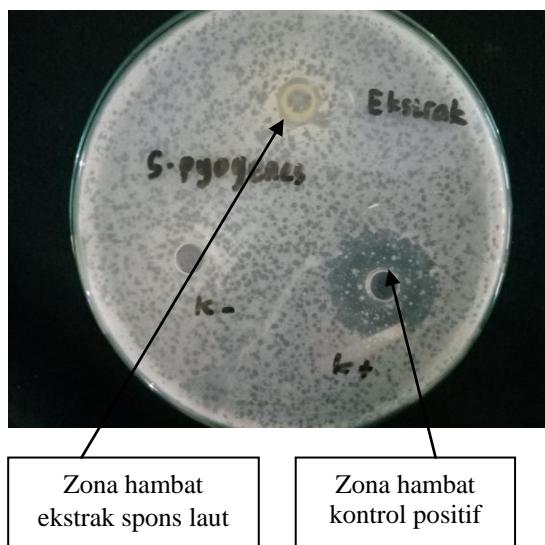
Tabel 1. Perbandingan diameter zona hambat kontrol negatif (akuades), kontrol positif (siprofloksasin), dan ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* terhadap bakteri *Salmonella typhi*

Cawan Petri	<i>Salmonella typhi</i>		
	Kontrol negatif	Kontrol positif	Ekstrak
I	0	17,5	3,5
II	0	18	4,5
III	0	18	4

Streptococcus pyogenes

Zona hambat yang terbentuk pada media perlakuan bakteri *Streptococcus pyogenes* dapat dilihat pada Gambar 3.

Perbandingan diameter zona hambat kontrol negatif (akuades), kontrol positif (siprofloksasin), dan ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* dapat dilihat pada Tabel 2 yang menunjukkan zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur yang diberi kontrol positif (siprofloksasin) lebih besar dari zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur yang diberi ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa*.



Gambar 3. Zona hambat yang terbentuk terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*

Tabel 2. Perbandingan diameter zona hambat kontrol negatif (akuades), kontrol positif (siprofloksasin), dan ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*

Cawan Petri	<i>Streptococcus pyogenes</i>		
	Kontrol negatif	Kontrol positif	Ekstrak
I	0	24,5	5,5
II	0	21	6,5
III	0	24,5	6
Total	0	70	18
Rerata	0	23,3	6

Diameter rerata zona hambat yang terbentuk pada bakteri *Streptococcus pyogenes* lebih besar dari zona hambat yang terbentuk pada bakteri *Salmonella typhi* (Tabel 3).

Tabel 3. Perbandingan diameter zona hambat kontrol negatif (akuades), kontrol positif (siprofloksasin), dan ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*.

Cawan Petri	<i>Salmonella typhi</i>			<i>Streptococcus pyogenes</i>		
	K (-)	K (+)	Ekstrak	K (-)	K (+)	Ekstrak
I	0	17,5	3,5	0	24,5	5,5
II	0	18	4,5	0	21	6,5
III	0	18	4	0	24,5	6
Total	0	53,5	12	0	70	18
Rerata	0	17,8	4	0	23,3	6

BAHASAN

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental untuk mengetahui daya hambat ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*. Dalam penelitian ini digunakan metode sumuran Kirby-Bauer yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan ekstrak yang akan diuji. Daerah jernih yang terbentuk di sekitar sumur pada media MHA menunjukkan kemampuan ekstrak

spons laut dan kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Metode sumuran dipilih karena mudah dilakukan dan tidak membutuhkan waktu yang banyak. Selain itu, metode difusi dengan sumuran memiliki tingkat sensitivitas lebih tinggi dibanding dengan varian cakram. Adanya partikel tersuspensi pada sampel yang diuji, jauh lebih kecil kemungkinannya untuk mengganggu difusi zat antimikroba ke dalam agar daripada pada cakram kertas saring.¹⁷ Pada penelitian ini, akuades digunakan sebagai kontrol negatif karena merupakan larutan pengencer pada ekstrak spons laut dan

kontrol positif. Hasilnya, disekitar sumur yang diberi akuades sebagai kontrol negatif tidak ditemukan terbentuknya zona hambat. Hal tersebut membuktikan bahwa terbentuknya zona hambat di sekitar sumur yang diberi ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* tidak ada pengaruh dari larutan pengencer.

Antibiotik siprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif untuk membandingkan daya hambat antara obat antimikroba dengan ekstrak spons laut. Pemilihan siprofloksasin sebagai kontrol positif karena siprofloksasin merupakan antimikroba spektrum luas.¹⁸ Pada penelitian ini, didapatkan hasil adanya zona hambat yang terbentuk disekitar sumur. Bila dibandingkan dengan zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur yang diberi siprofloksasin, zona hambat ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* lebih kecil.

Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan pada uji daya hambat menunjukkan bahwa dengan pemberian ekstrak spons ke dalam sumur pada media MHA yang sudah diinokulasi dengan bakteri uji didapatkan adanya zona hambat, artinya ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* kemungkinan memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes*.

Lebar diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur dapat dijadikan sebagai parameter untuk melihat kekuatan senyawa bioaktif yang terkandung dalam spons laut. Semakin luas zona hambat yang terbentuk, maka semakin kuat senyawa bioaktif menghambat pertumbuhan bakteri. Kriteria kekuatan daya hambat sebagai berikut: diameter zona hambat ≤ 5 mm dikategorikan lemah, zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat dan zona hambat ≥ 20 mm dikategorikan sangat kuat.¹⁹ Berdasarkan kriteria tersebut, maka daya hambat ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* pada bakteri *Salmonella typhi* dengan konsentrasi 100mg/ml termasuk lemah yaitu 4 mm. Daya hambat ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* pada bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan

konsentrasi yang sama 100mg/ml termasuk sedang yaitu 6 mm.

Terbentuknya zona hambat dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa*. Hal tersebut telah dilaporkan oleh penelitian yang dilakukan oleh Krisyuninda¹⁰ yang mendapatkan adanya kandungan steroid, alkaloid, flavonoid dan treponoid, yang didukung oleh hasil penelitian sebelumnya oleh Cowan¹¹ yang menyatakan bahwa dalam ekstrak spons laut *Callyspongia* sp. terdapat senyawa steroid, alkaloid, flavonoid, dan antrakuinon.

Mekanisme penghambatan bakteri oleh senyawa steroid diduga dengan cara merusak membran sel bakteri. Steroid dapat meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga akan terjadi kebocoran sel yang diikuti dengan keluarnya materi intrasel.^{11,20} Senyawa flavonoid memiliki spektrum aktivitas antimikroba yang luas dan dapat mengurangi ketebalan pada organisme sasaran. Sifat antibakteri senyawa flavonoid ialah dengan menyebabkan terjadinya denaturasi protein di dalam sel bakteri.^{21,22} Mekanisme penghambatan bakteri oleh senyawa alkaloid diduga dengan cara merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut.^{21,23}

Hasil penelitian ini dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Warbung et al.³ yaitu daya hambat ekstrak spons laut *Callyspongia* sp. terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (bakteri gram positif) menunjukkan perbedaan nilai yang cukup bermakna, terutama untuk bakteri uji *Streptococcus pyogenes* (bakteri gram positif). Hal ini terjadi kemungkinan karena spesies sampel yang digunakan berbeda. Pada penelitian ini yang digunakan ialah *Callyspongia aerizusa*. Menurut penelitian Hanani et al.²⁴ pada tahun 2005 tentang identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu menunjukkan bahwa ekstrak *Callyspongia*

sp. hanya mengandung senyawa alkaloid. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa setiap spesies dari *Callyspongia* sp. memiliki kandungan yang berbeda-beda. Dalam penelitian ini tidak dilakukan analisis fitokimia pada ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* sehingga tidak diketahui zat aktif yang terkandung yang dapat menghambat bakteri dan bagaimana mekanisme kerjanya.

Hasil pengukuran juga menunjukkan diameter rerata zona hambat yang terbentuk pada media tanam bakteri *Streptococcus pyogenes* lebih besar dari pada bakteri *Salmonella typhi*. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri Gram positif lebih rentan terhadap zat aktif dalam ekstrak dibandingkan bakteri Gram negatif, karena perbedaan struktur dinding sel. Bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel dengan struktur lipopolisakarida kompleks yang dapat menghalangi penetrasi ekstrak ke dalam sel mikroba, sedangkan pada bakteri Gram positif membran luarnya dibentuk oleh lapisan peptidoglikan yang mudah ditembus oleh senyawa aktif dalam bahan uji.^{14,16,25}

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* (rerata diameter zona hambat 4 mm) dikategorikan lemah dan *Streptococcus pyogenes* (rerata diameter zona hambat 6 mm) dikategorikan sedang. Daya hambat ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* masih lebih kecil dibandingkan dengan obat antimikroba siprofloksasin.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dikategorikan lemah dan *Streptococcus pyogenes* dikategorikan sedang. Daya hambat ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* masih lebih lemah dibandingkan dengan obat antimikroba siprofloksasin.

SARAN

Perlu dilakukan analisis fitokimia untuk mengetahui jenis senyawa aktif spons laut *Callyspongia aerizusa* yang menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes* dan bagaimana mekanisme kerjanya.

Perlu dilakukan penelitian selanjutnya mengenai uji daya hambat ekstrak spons laut *Callyspongia aerizusa* terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Streptococcus pyogenes* pada berbagai konsentrasi kepekatan ekstrak.

DAFTAR PUSTAKA

1. **Darsono P.** Pemanfaatan sumber daya laut dan implikasinya bagi masyarakat nelayan. Makalah disajikan dalam Seminar Nasional Pengelolaan Sumber Daya Kelautan demi Peningkatan Kesejahteraan Rakyat, Jakarta, Indonesia, 1999.
2. **Sumaryono W, Wibowo AE, Cahidir.** Isolasi dan elsidasi struktur senyawa utama dari sponge *axynissa aplysinoides*. Majalah Farmasi Indonesia. 2005; 16(4):1113-20.
3. **Warbung YY, Wowor VNS, Posangi J.** Daya hambat ekstrak spons laut *callyspongia* sp. terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Jurnal Ilmiah Kedokteran Gigi. 2013;1(2).
4. **Suparno.** Kajian bioaktif spons laut (porifera: demospongiae) suatu peluang alternatif pemanfaatan ekosistem karang Indonesia dalam dibidang farmasi, Bogor, Indonesia. Makalah pribadi falsafah sains. 2005.
5. **Haris A, Arniati, Werorilangi S.** Uji antibakteri patogen ekstrak sponge menggunakan metode *High Throughput Screening* (HTS) dengan indikator MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-Yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). 2013 [cited 2 Sep 2017]. Available from: Hasanuddin University Jurusan Ilmu Kelautan <http://repository.unhas.ac.id/handle/123456789/9769>.
6. **Haris A, Weorilangi S, Gosalam S, & Mas'ud, A.** Komposisi jenis dan kepadatan sponge (porifera: demospongiae) di kepulauan Spermonde Kota Makasar. Jurnal Biota. 2014;19(1):36-42.

7. **Haris A.** Sponge: biologi dan ekologi. Makalah yang tidak dipublikasikan. 2013.
8. **Samawi MF, Rani C, Ramli.** Keterkaitan antara kondisi oseanografi dengan komposisi jenis dan kepadatan sponge laut di kepulauan Spermonde. Makassar: Faculty of Marine Science and Fishery Hasanuddin University; 2009.
9. **Mengelea FP, Posangi J, Wowor MP, Bara R.** Uji efek antibakteri jamur endosimbion spons laut *Callyspongia* sp. terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Eschericia coli*. eBm. 2015;3(1).
10. **Kriyuninda M.** Uji toksisitasfraksi spons *Callyspongia* sp. dengan metode brine shrimp test dari perairan pasir putih situbondo. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh November; 2012.
11. **Cowan M.** Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564-82.
12. **Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G,** et al. Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50.000 years old. Journal of Infect Genet Evol. 2002;2:39-45.
13. **Vollaard AM, Ali S, van Asten HA, Widjaja S, Visser LG, Surjadi C,** et al. Risk factor for typhoid fever and paratyphoid fever in Jakarta, Indonesia. J Am Med Assoc. 2004;291:2607-15.
14. **Gianella RA.** Salmonella. In: Baron S, editor. Medical Microbiology (4th ed). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
15. **Kusuma SAF.** *Streptococcus pyogenes*. 2010 Mar 5 [cited 27 Agustus 2017]. Available from: http://pustaka.unpad.ac.id/wpcontent/uploads/2011/09/pustaka_unpad_streptococcus-pyogenes.pdf.
16. **Patterson MJ.** Streptococcus. In: Baron S, editor. Medical Microbiology (4th ed). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
17. **Valgas C, de Souza SM, Sumania EFA, & Sumania A.** Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Braz J Microbiol. 2007;38:369-80.
18. **Ganiswarna S, Setiabudy R, Suryatna FD, Purwastyastuti, Nafrialdi** (Editors). Farmakologi dan Terapi (5th ed). Jakarta: Balai Penerbit FKUI, 1995.
19. **Davis WW, Stout TR.** Disc plate methods of microbiological antibiotic assay. Microbiol. 1971;22(4):659-65.
20. **Hardiningtyas S.** Aktivitas antibakteri ekstrak karang lunak *Sarcophyton* sp. yang difragmentasi dan tidak difragmentasi di perairan Pulau Pramuka Kepulauan Seribu [Skripsi]. Bogor: IPB; 2009.
21. **Wulandari R, Utami P, Hartanti D.** Penapisan fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol herba pulutan (*Urena lobata* Linn.) Pharmacy. 2009;6(1).
22. **Dewanti S.** Antibacteri activity of bay leaf infuse (Folia syzygium polyyanthum WIGHT) to *Eschericia coli*in-vitro. Jurnal Medika Planta. 2011;1(4).
23. **Smith AJ, Jackson MS, Bagg J.** The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. J Med Microbiol. 2011; 50(11):940-6.
24. **Hanani E, Mun'im A, Sakarini R.** Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. Majalah Ilmu Kefarmasian. 2005;2(3):127-33.
25. **Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM.** Color Atlas of Medical Microbiology. New York: Thieme, 2005.