

PENINGKATAN AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK NANAS (*Ananas comosus* (L.) Merr) DENGAN PEMBENTUKAN NANOPARTIKEL

Deni Rahmat*, Dian Ratih L., Liliek Nurhidayati, Meilda Ayu Bathini

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta

*Email : mangnden78@yahoo.com

ABSTRAK

Bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) mengandung enzim bromelain dengan kadar tertinggi dibandingkan bagian nanas lainnya. Salah satu fungsi enzim bromelain adalah sebagai antimikroba. Ekstrak bonggol nanas dibuat dalam bentuk nanopartikel dengan menggunakan kitosan kemudian dikeringkan dengan metode *freeze drying*. Serbuk kering ekstrak ditentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terhadap *Staphylococcus aureus*. Nanopartikel ekstrak kering dilakukan uji ukuran partikel, zeta potensial, dan morfologi partikel. Nanopartikel ekstrak kemudian diformulasikan ke dalam bentuk sediaan gel. Tiap formula dilakukan uji mutu fisik antara lain organoleptik, homogenitas, viskositas dan sifat alir dan uji mutu kimia (pH). Hasil penelitian menunjukkan nanopartikel ekstrak memiliki ukuran partikel 60,8 nm dan bentuk partikel kering sferis. Ekstrak bonggol nanas memiliki KHM pada konsentrasi 1,25%. Gel formula IV menunjukkan DDH tertinggi yaitu 62,5 mm dan memiliki viskositas dan pH yang stabil. Dengan demikian pembuatan nanopartikel pada ekstrak bonggol nanas dapat meningkatkan aktivitas antimikroba dalam sediaan gel untuk penggunaan secara topikal

Kata kunci: Bonggol nanas, nanopartikel, kitosan, antimikroba

PENDAHULUAN

Nanas (*Ananas comosus* L), berdasarkan informasi dari masyarakat serta buku obat-obatan tradisional, tidak hanya mempunyai nilai ekonomi penting, tetapi juga bermanfaat bagi kesehatan sebagai obat penyembuh penyakit sembelit, gangguan saluran kencing, mual-mual, flu, wasir, kurang darah, penyakit kulit (gatal-gatal, eksim dan kudis) (1). Buah nanas mengandung enzim bromelain, kalsium, fosfor, vitamin A, B, C, lemak, karbohidrat, magnesium, kalium, dekstrosa, sukrosa dan air (2). Kandungan bromelain pada nanas dapat digunakan sebagai antiseptik mulut, antibakteri, antifungi dan desinfektan.

Enzim bromelain merupakan suatu enzim protease yang mampu

menghidrolisis ikatan peptida menjadi asam amino. Konsentrasi bromelain yang terdapat pada bonggol nanas lebih tinggi dibanding pada daging buah nanas (3). Selain itu, kandungan vitamin A berfungsi untuk menjaga kesehatan kulit dan memperbaiki sel kulit yang rusak, vitamin B berfungsi untuk mencegah kerontokan dan vitamin C pada nanas berfungsi untuk memberi nutrisi bagi kulit (2).

Salah satu upaya pengembangan sediaan gel terhadap formulasi ekstrak bonggol nanas tersebut adalah pembentukan nanopartikel dengan bahan pembawa yang dibuat dalam ukuran nanometer. Bahan matriks pembawa obat yang digunakan dalam teknologi nanopartikel salah satunya adalah kitosan. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan daya penetrasi, memperlama waktu kontak sehingga meningkatkan efektifitas.

Penggunaan kitosan dalam bentuk nanopartikel dipilih karena memiliki sifat biokompatibel, biodegradable, toksisitas rendah dan mukoadhesif (3).

Berdasarkan kandungan kimia dan manfaat dari bonggol nanas (*Ananas comosus*. L) maka dilakukan penelitian dengan memformulasi gel dari ekstrak nanopartikel bonggol nanas (*Ananas comosus*. L) untuk mengatasi penyakit kulit yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini akan dilakukan formulasi dan evaluasi sediaan gel yang mengandung nanopartikel ekstrak bonggol nanas yang mengandung bromelain dengan melakukan uji aktifitas antibakteri terhadap *Staphylococcus* dengan bahan pembentuk gel hidroksi propil metil selulosa (HPMC).

METODE

Bahan

Bonggol nanas (*Ananas comosus*.(L.).Merr), kitosan, HPMC, propilen glikol, metil paraben, propil paraben, natrium metabisulfit, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, nutrient agar (NA), kaldu pepton, air suling, dapar fosfat pH 7, NaOH, CuSO₄.

Alat

Homogenizer, freeze dryer, viskometer brookfield tipe RV, alat uji kemampuan menyebarkan, pH meter, *object glass*, timbangan analitik, jarum suntik, *particle sizer*, pengukur potensial zeta, *scanning electron microscope* (SEM), jarum ose, labu spiritus, pengaduk magnetik/*stirer, laminar air flow*, autoklaf, oven, cawan petri, tabung reaksi, inkubator, vortex, serta alat gelas lainnya (presisi dan non presisi).

Pembuatan ekstrak dari bonggol nanas

Bonggol nanas yang telah dibersihkan dipotong kecil-kecil ditambahkan *buffer* fosfat 0,1M pH 7 kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender. Hasil blender diperas dan disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, sehingga diperoleh filtrat.

Pembuatan nanopartikel ekstrak bonggol nanas dengan kitosan

Kitosan sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 100 ml asam asetat glasial 1% menggunakan magnetik stirer sehingga diperoleh larutan induk kitosan 1%. Ambil 80 ml larutan kitosan 1% kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ke 100 ml ekstrak bonggol nanas diatas magnetik stirer, kemudian pengadukan dilanjutkan selama 30 menit agar didapat larutan nanopartikel ekstrak bonggol nanas yang stabil.

Evaluasi nanopartikel ekstrak bonggol nanas

- Pemeriksaan ukuran partikel
- Pemeriksaan potensial zeta
- Pemeriksaan morfologi partikel dengan *scanning electron microscope* (SEM).

Uji identifikasi bromelain kasar ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas

3 ml ekstrak bonggol nanas (sampel) dibuat alkalis dengan NaOH kemudian ditambahkan larutan CuSO₄ encer. Uji ini memberikan reaksi positif yang ditandai dengan timbulnya warna merah violet atau biru violet.

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas

Mikroba uji diremajakan pada media nutrient broth dengan 25% T. Uji

KHM dilakukan dengan metode pengenceran seri pada tabung. Dibuat 10 seri larutan pengenceran ekstrak masing-masing 3 ml kemudian ditanam mikroba uji *Staphylococcus aureus* yang telah diremajakan dengan jumlah yang sama. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Uji aktivitas ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas secara *in vitro*

Pengujian aktivitas antimikroba dari serbuk kering nanopartikel bonggol nanas terhadap *Staphylococcus aureus*

dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram. Dimasukkan suspensi bakteri 25%T sebanyak 100 µl dan 20 ml *nutrient agar* pada suhu 45-50 °C pada cawan petri, pembenihan dihomogenkan dan dibiarkan memadat pada suhu kamar. Setelah memadat letakkan kertas cakram yang telah dijenuhkan dengan sediaan yang diuji. Masing-masing cawan petri kemudian diinkubasi dalam keadaan posisi terbalik pada suhu 37 °C selama 48 jam. Aktivitas antibakteri diamati berdasarkan pengukuran diameter daerah hambat (DDH).

Formulasi gel

Tabel 1. Formula gel

Bahan	Jumlah (%)				
	Blangko	I	II	III	IV
Ekstrak bonggol nanas	-	1xKHM	-	-	-
Nanopartikel ekstrak bonggol nanas	-	-	1xKHM	3xKHM	5xKHM
HPMC	1	1	1	1	1
Propilen glikol	15	15	15	15	15
Natrium metabisulfit	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Metil paraben	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Propil paraben	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
NaOH	ad pH 7	ad pH 7	ad pH 7	ad pH 7	ad pH 7
Aquadest ad	100	100	100	100	100

Hidroksi propil metil selulosa dikembangkan didalam air suling suhu 60-70 °C, kemudian tambahkan ekstrak bonggol nanas atau nanopartikel ekstrak yang telah dicampurkan dengan propilen glikol. Tambahkan dengan metil paraben, propil paraben dan natrium metabisulfit. pH diatur dengan NaOH sampai pH 7. Campuran diaduk sampai homogen. Gel yang terbentuk dievaluasi organoleptik, homogenitas, viskositas dan pH selama 1 bulan.

HASIL DAN DISKUSI

Tanaman nanas yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari pasar Cisalak, Depok. Nanas yang digunakan adalah nanas yang sudah matang. Bagian yg diambil dari buah nanas adalah bonggolnya yang sudah dicuci kemudian dipotong-potong untuk dijadikan ekstrak dan nanopartikel. Pemeriksaan ukuran partikel larutan nanopartikel ekstrak bonggol nanas menggunakan alat Delsa™Nano dengan hasil pengukuran pada Table 2.

Tabel 2. Hasil uji pemeriksaan ukuran partikel

Pengujian	Rata-rata Diameter Partikel (nm)	Standard Deviasi
1	51.9	13.2
2	64.9	16.7
3	65.6	17.1
Rata-rata	60.8	-

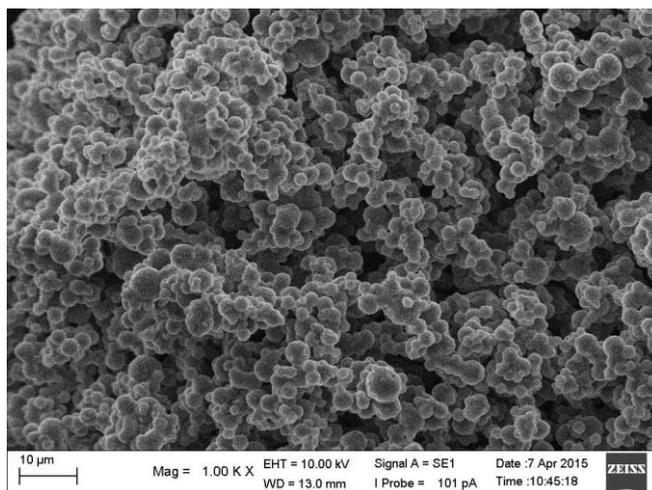
Suatu partikel dikatakan memiliki ukuran nanopartikel jika diameter partikel berukuran 10-1000 nm. Data hasil uji pemeriksaan ukuran partikel pada suspensi nanopartikel ekstrak bonggol nanas menunjukkan ukuran partikel yang memenuhi syarat yaitu 51.9; 64.9, dan 65.4 nm sehingga nanopartikel ekstrak bonggol nanas memenuhi persyaratan. Distribusi ukuran partikel dinyatakan dalam indeks polidispersitas. Rentang indeks polidispersitas berada antara 0 sampai dengan 1. Nilai indeks polidispersitas mendekati 0 menunjukkan dispersi yang homogen. Sedangkan indeks polidispersitas dengan nilai lebih dari 0,5 menunjukkan heterogenitas yang tinggi. Hasil dari nanopartikel ekstrak bonggol nanas memiliki indeks polidispersitas sekitar 0,426-0,479 sehingga nanopartikel ekstrak bonggol nanas menunjukkan dispersi yang relatif homogen.

Tabel 3. Hasil uji potensial zeta

Pengujian	Zeta Potensial (mV)
1	368.05
2	364.36
Rata-rata	364,21

Pemeriksaan potensial zeta suspensi nanopartikel ekstrak bonggol nanas menggunakan alat DelsaTMNano dengan hasil tertera pada Tabel 3. Semakin besar kekuatan tolak menolak antar partikel maka semakin kecil kemungkinan partikel bergabung dan membentuk agregat. Efek ini berhubungan dengan pengikatan gugus anionik oleh gugus amin yang panjang dari kitosan untuk menjaga nilai elektrik yang tinggi sehingga dapat mencegah terjadinya agregasi. Nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih dari +/- 30 mV telah terbukti stabil yang dapat mencegah terbentuknya agregasi. Data hasil uji potensial zeta larutan nanopartikel ekstrak bonggol nanas menunjukkan rata-rata potensial 364,21 mV. Nilai yang tinggi ini diakibatkan oleh kehadiran komponen dapar fosfat dalam ekstrak.

Pemeriksaan morfologi partikel dilakukan dengan menyiapkan 1 g serbuk nanopartikel ekstrak bonggol nanas hasil pengeringan dengan menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM). Hasil pemeriksaan morfologi partikel dari nanopartikel ekstrak bonggol nanas dapat dilihat pada Gambar 1 dimana menunjukkan partikel yang berbentuk sferis dan berukuran lebih besar akibat adanya penumpukan partikel yang jumlahnya banyak.



Gambar 1. Morfologi partikel kering

Tabel 4. Hasil Pemeriksaan Organoleptik Serbuk

Jenis Ekstrak	Warna	Bau	Rasa	Sifat Serbuk
Nanopartikel Ekstrak Bonggol Nanas	Kuning kecoklatan	Bau khas asam yang kuat	Manis	Halus, higroskopis
Ekstrak Bonggol Nanas	Coklat tua	Bau khas asam yang kuat	Manis	Higroskopis, agak lengket

Tabel 5. Hasil Pengamatan Konsentrasi Hambat Minimum

Konsentrasi (%)	Hasil Pengamatan
10	-
5	-
2.5	-
1.25	-
0.625	+
0.3125	+
0.1563	+
0.0781	+
0.0391	+
0.0195	+

Keterangan

+: adanya pertumbuhan bakteri

- : tidak terjadi pertumbuhan bakteri

Konsentrasi Hambat minimum digunakan untuk menentukan dosis ekstrak bonggol nanas secara kualitatif. Dibuat seri pengenceran kaldu pepton dengan 10 konsentrasi yang berbeda dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Pengamatan setelah inkubasi dapat dilihat pada Tabel 5.

Dari hasil pengamatan dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi 10, 5, 2.5, dan 1.25% didapat hasil (-) yang artinya tidak terjadi pertumbuhan bakteri.

Sehingga dapat ditetapkan Konsentrasi Hambat Minimum ekstrak bonggol nanas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 1,25%.

Uji KHM kemudian dilanjutkan secara kuantitatif dengan uji Diameter Daerah Hambat (DDH) yang menggunakan metode difusi agar dengan kertas cakram yang telah dijenuhkan selama 15 menit didalam ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas

dengan konsentrasi 1.25%. Kemudian kertas cakram tersebut diletakkan diatas Nutrient Agar yang telah dihomogenkan dengan suspensi bakteri terlebih dahulu lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Daerah bening yang terlihat disekitar kertas cakram menunjukkan zona hambat bakteri. Hasil DDH ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Diameter Daerah Hambat ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas pada konsentrasi 1.25%

Kertas Cakram	DDH Ekstrak Bonggol Nanas 1.25% (mm)	DDH Nanopartikel Ekstrak Bonggol Nanas 1.25% (mm)
1	18±3,15	22.75±3,56
2	17.25±2,79	23.55±2,84
3	16.75±4,57	22.80±3,56
4	17.25±2,95	23±2,87
Rata-rata	17.3125±4,11	23.025±3,86

Berdasarkan data DDH ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas dapat dilihat bahwa dalam ukuran nanopartikel ekstrak bonggol nanas menghasilkan zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak bonggol nanas.

Uji stabilitas fisik gel ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas dilakukan pada suhu kamar dan 4 °C selama satu bulan. Uji stabilitas dilakukan terhadap formula blangko, I, II, III dan IV mulai dari minggu 0 sampai dengan minggu ke 4. Pengamatan uji stabilitas fisik gel meliputi organoleptik, viskositas dan sifat alir dan pH. Hasil pengamatan uji organoleptik gel bonggol nanas dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Pengamatan organoleptik gel ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas

Formula	Organoleptik	Waktu (minggu)					
		0	1	2	3	4	
Blangko	25°C	Warna	Jernih	Jernih	Jernih	jernih	Jernih
		Bau	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah
	4°C	Warna	Jernih	Jernih	jernih	jernih	Jernih
		Bau	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah
I	25°C	Warna	Kuning muda				
		Bau	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah
	4°C	Warna	Kuning muda				
		Bau	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah	Lemah

Berdasarkan data diatas, semua formula tidak mengalami perubahan organoleptik berupa warna dan bau setelah dilakukan pengamatan selama satu bulan pada suhu kamar dan 4 °C. Sehingga, secara organoleptik sediaan gel dinyatakan stabil.

Uji homogenitas dimaksudkan untuk mengetahui apakah sediaan gel yang dibuat tercampur homogen atau tidak. Uji ini dilakukan dengan mengoleskan sediaan pada kaca objek

yang direkatkan dengan kaca objek lain kemudian dilihat homogenitasnya. Sediaan gel baik yang disimpan pada suhu kamar maupun pada suhu penyimpanan 4 °C homogen setelah dilakukan pengamatan dari minggu 0 sampai minggu ke 4.

Viskositas sediaan gel ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas didapat dengan menggunakan viskosimeter Brookfield. Data dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8.. Hasil evaluasi viksositas sediaan gel

Formula	Viskositas (Poise) RPM 10	
Blangko	25°C	4300±5,88
	4°C	4300±4,54
I	25°C	3450±3,23
	4°C	3750±2,70
II	25°C	3250±3,03
	4°C	3550±7,55
III	25°C	3000±0,00
	4°C	3500±5,55
IV	25°C	2800±0,00
	4°C	3300±5,88

Berdasarkan hasil pengamatan grafik viskositas gel ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas pada rpm 10 dapat diamati bahwa kelima formula mengalami peningkatan viskositas pada suhu penyimpanan 4 °C. Hal ini disebabkan karena suhu dapat mempengaruhi viskositas sediaan.

Hasil analisis viskositas menggunakan ANOVA dua arah menunjukkan bahwa pada blangko, formula II, III dan IV menunjukkan p-value >0,05 terhadap waktu dan suhu artinya tidak ada perbedaan bermakna antara formula terhadap waktu penyimpanan selama 4 minggu maupun terhadap suhu penyimpanan 25 °C atau 4 °C. Sedangkan pada formula I menunjukkan p-value <0,05 terhadap waktu penyimpanan dan

suhu yang artinya ada perbedaan bermakna antara formula I terhadap waktu dan suhu penyimpanan.

Hasil uji pH dimaksudkan untuk mengetahui apakah pH sediaan gel stabil selama penyimpanan pada suhu kamar dan suhu 4 °C selama 1 bulan. pH yang diatur agar sesuai dengan pH kulit.

Berdasarkan data hasil uji ANOVA dua arah menunjukkan bahwa pada blangko, formula I, II, dan IV menunjukkan p-value >0,05 terhadap waktu dan suhu artinya tidak ada perbedaan bermakna antara blangko, formula I, II dan IV terhadap waktu penyimpanan selama 4 minggu maupun terhadap suhu penyimpanan 25 °C atau 4 °C. Sedangkan formula III menunjukkan p-value <0,05 terhadap suhu yang artinya ada perbedaan bermakna antara formula

III terhadap suhu penyimpanan 25 °C dan 4 °C dan p-value >0,05 terhadap waktu yang artinya tidak ada perbedaan bermakna antara formula III terhadap waktu penyimpanan 4 minggu.

Uji DDH terhadap gel dilakukan untuk mengetahui apakah ada perubahan aktivitas anti mikroba dari ekstrak dan nanopartikel ekstrak bonggol nanas sebelum dan sesudah di formulasi. Hasil uji DDH sediaan gel dapat diamati pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil uji DDH pada sediaan gel

Formula	DDH (mm)
Blangko	0±0,00
I	16.90±2,52
II	22.60±3,30
III	42.00±4,26
IV	62.5±3,67

Berdasarkan data uji DDH sediaan gel dapat dilihat ada sedikit penurunan aktivitas antimikroba pada formula I (yang mengandung ekstrak bonggol nanas 1xKHM) yaitu sebelum diformulasi didapati DDH 17.3125 ±4.11 mm menjadi 16.90 ± 2.52 mm setelah diformulasi. Begitupun pada formula II (yang mengandung nanopartikel ekstrak bonggol nanas 1xKHM) didapati penurunan aktivitas yaitu sebelum di formulasi didapati DDH 23.025 ± 3.86 mm menjadi 22.60 ± 3.30 mm setelah diformulasi. Pada blangko tidak didapati adanya zona hambat bakteri dikarenakan pada blangko tidak mengandung ekstrak atau nanopartikel ekstrak bonggol nanas. Sedangkan pada formula III (yang mengandung nanopartikel ekstrak bonggol nanas 3x KHM) didapat DDH 42.00 mm dan pada formula IV (yang mengandung nanopartikel ekstrak bonggol nanas 5xKHM) didapat DDH 62.5 mm.

Hasil uji DDH berdasarkan hasil ANOVA satu arah menunjukkan bahwa p-value <0,05 yang artinya ada perbedaan

bermakna antara DDH dari tiap formula. Setelah diuji lebih lanjut terlihat bahwa semua DDH formula berbeda bermakna dengan formula lainnya dengan p-value <0,05. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi nanopartikel ekstrak mempengaruhi DDH sediaan.

KESIMPULAN

1. Ekstrak bonggol nanas dapat dijadikan nanopartikel dengan menggunakan kitosan 1% dengan dapar fosfat pH 7 dengan rata-rata ukuran partikel 60,8 nm.
2. Ekstrak bonggol nanas memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM): 1,25% dan Diameter Daerah Hambat (DDH) sebesar 17,3125 ± 4,11 mm.
3. Aktivitas antibakteri nanopartikel menunjukkan Diameter Daerah Hambat (DDH) 23,025 ± 3,86 mm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anggraini D, Rahmides WS, Malik M. Formulasi Sabun Cair dari Ekstrak Batang Nanas (*Ananas comosus*.L) untuk Mengatasi Jamur *Candida albicans*. Riau: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau. Padang: Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang; 2012. h.30.
2. Putra AR. Formulasi Sampo Ekstrak Buah Nanas Dengan Variasi Konsentrasi HPMC Sebagai Pengental Dan Penstabil Busa. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 2010.
3. Rahayu A. Formulasi Tablet Dari Nanopartikel Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* [Burm.f.] Ness) Dengan Metode Cetak Langsung. Jakarta: Fakultas Farmasi Univeristas Pancasila; 2014.
4. Kantor Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi.Ttg Budidaya Pertanian. Jakarta: Kantor

- Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi; 2000. h. 1-17.
5. Tranggono RI, Latifah F. Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama; 2006. h.33-35;132-133.
 6. Alternative Medicine Review. Bromelain Monograph; 2010. Vol 15. No 4. p. 361-364.
 7. Achmad N. Reaksi Analisa Protein. 2011. h. 1-2.
 8. Sinaga SR. Uji Banding Efektivitas Perasan Jeruk Purut (*Citrus hystrix DC*) dengan Zinc Pyrithione 1% Terhadap Pertumbuhan *Pityrosporum ovale* pada Penderita Berketombe. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro; 2012. h.1,8-9.
 9. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition. Baltimore: William & Wilkins; 1994.
 10. Lachman L, Lieberman HA. Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1. New York: Marcel Dekker; 1980.