

KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA MINYAK ATSIRI DAUN DAN BATANG NILAM(*Pogostemon cablin* Benth)

Muhammad Fauzi¹, Nilda Lely²

¹Farmasi Universitas Kader Bangsa

²Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bhakti Pertiwi Palembang

e-mail :¹Fauziora45@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan pemisahan minyak atsiri dari daun dan batang nilam (*Pogostemon cablin* Benth) dengan menggunakan metode destilasi uap air. Karakterisasi komponen senyawanya menggunakan metode KG-SM serta uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar. Hasil karakterisasi minyak atsiri dari daun dan batang nilam didapat 10 puncak yaitu patchouli alkohol (48,06%), δ guaiene (18,24%), α guaiene (13,14%), α patchoulene (6,49%), seychellene (5,85%), β caryophyllene (3,01%), azulene (2,66%), β patchoulene (1,24%), β elemene (0,96%), dan α humulene (0,34%). Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan 5 variasi konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%. Pengujian dilakukan terhadap tiga mikroba yang berbeda yaitu *Streptococcus mutans* ATCC 31987, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dan *Candida albicans* ATCC 01231. Minyak atsiri dari daun dan batang nilam mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dengan diameter hambat terbesar diberikan pada konsentrasi 50 % sebesar 19,1 mm, sedangkan terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans* tidak memperlihatkan adanya aktivitas antimikroba.

Kata kunci :Daun dan batang nilam (*Pogostemon cablin* Benth), *Candida albicans* ATCC 01231, difusi agar, minyak atsiri, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Streptococcus mutans* ATCC 31987

PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia mengenal dan memakai tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya dalam penanggulangan masalah kesehatan yang dihadapinya. Hingga saat ini tanaman obat banyak digunakan baik dibidang kosmetik maupun obat-obatan. Tanaman obat masih tetap dipelajari tidak hanya karena tradisi, tetapi terutama karena nilainya dibidang farmasi. Salah satu tanaman yang sudah dikenal dalam masyarakat dan digunakan sebagai obat adalah nilam (*Pogostemon cablin* Benth) (Wijayakusuma *et al*, 1992 ; Heyne, 1987).

Nilam telah digunakan sebagai obat tradisional diantaranya sebagai obat pencuci luka, obat disentri, obat diare, obat pencuci rambut, obat wasir dan menghilangkan bau keringat (Kementrian Negara Riset dan

Teknologi, 2006). Di pasar perdagangan internasional, nilam (*Pogostemon cablin* Benth) diperdagangkan dalam bentuk minyak dan dikenal dengan nama *Patchouli oil* (Santoso, 1990).

Minyak nilam adalah minyak atsiri yang diperoleh dari tanaman nilam dengan cara penyulingan. Sebagai komoditi ekspor, minyak nilam mempunyai prospek yang baik karena dibutuhkan secara kontinu dalam industri parfum, kosmetik, sabun, farmasi, *flavouring agent* dan lain-lain. Penelitian-penelitian sebelumnya tentang minyak nilam menunjukkan bahwa minyak nilam mempunyai beberapa aktivitas farmakologi seperti sifat antiemetik, antibakterial, antifungal dan aktivitas antagonis Ca^{2+} (Kiuchi *et al*, 2004).

Antibakteri merupakan obat yang mempunyai aktivitas menghambat

(*bakteriostatik*) atau membunuh bakteri (*bakterisid*), khususnya bakteri yang merugikan manusia. Di tempat pengambilan sampel ini, daun nilam digunakan oleh masyarakat setempat untuk mengobati sakit gigi sedangkan minyak nilam digunakan untuk mengobati luka. *Streptococcus mutans* adalah salah satu bakteri penyebab gigi berlubang (Sirdaningsih, 2000), sedangkan *Pseudomonas aeruginosa* adalah salah satu bakteri yang menyebabkan infeksi pada luka dan luka bakar (Todar, 2008).

Berdasarkan penelitian sebelumnya telah diketahui adanya aktivitas antibakteri minyak atsiri dari daun nilam. Sedangkan jika dilihat dari rendemen minyak nilam yang terbesar diperoleh dari campuran daun dan batang nilam. Oleh karena itu, penulis tertarik melakukan karakterisasi minyak atsiri dari campuran daun dan batang nilam serta mengetahui aktivitas antimikrobanya.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat destilasi uap air, corong pisah, corong, vial, bunsen, cawan petri, timbangan analitik, gelas ukur, pipet tetes, tabung reaksi, beaker glass, pinset, erlemeyer, jarum ose, kapas, kassa steril, benang, gunting, spatel, jangka sorong, autoklaf (KAIPU), elektro thermal inkubator (DNP), kertas saring, *Laminer air flow* (Indotech), Spektrofotometri (PG-T 60) dan kromatografi gas spektrometri massa.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan batang nilam, aquadest, nutrisi agar (NA), *potato dextrose agar*, NaCl 0,9%, tween 80, aquadest, natrium sulfat anhidrat, kloramfenikol, nistatin, bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dan *Candida albicans* ATCC 01231.

Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun dan batang nilam yang diperoleh dari Desa Ujanmas Kecamatan Sungai Are Kabupaten OKU Selatan.

Klarifikasi Tanaman Nilam

Klarifikasi Tanaman Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor.

Isolasi Minyak Atsiri Daun dan Batang Nilam

Daun dan batang nilam dirajang lalu dikeringkan dan ditimbang sebanyak 5 kg lalu masukkan ke dalam dandang, dandang terlebih dahulu diisi dengan air sebanyak lebih kurang 10 cm dari bawah saringan. Kemudian didestilasi selama 8 jam sampai minyak habis. Setelah proses destilasi selesai, minyak yang didapat dipisahkan dengan corong pisah, setelah itu ditambahkan natrium sulfat anhidrat untuk menarik air yang kemungkinan masih terdapat dalam minyak atsiri yang didapat.

Pemeriksaan Organoleptis (Djamil, 2009)

Pemeriksaan ini meliputi pemeriksaan warna, bau dan rasa dari minyak atsiri yang didapat dari proses isolasi.

Pemeriksaan warna

Pemeriksaan warna dilakukan dengan cara melihat langsung minyak atsiri hasil destilasi secara visual.

Pemeriksaan bau

Pemeriksaan bau dilakukan dengan cara mencium bau minyak atsiri yang menguap di atas kertas saring.

Pemeriksaan rasa

Pemeriksaan rasa dilakukan dengan meneteskan minyak atsiri pada ujung lidah kemudian dibuang.

Pemeriksaan Tetapan Fisika

Penentuan bobot jenis (BJ) minyak atsiri yang didapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$BJ = \frac{\text{Massa}}$$

Volume

Piknometer volume 25 ml yang telah dibersihkan dan dikeringkan ditimbang pada neraca analitik. Piknometer diisi minyak atsiri daun dan batang nilam, ditutup lalu ditimbang. Nilai massa didapat dengan mengurangkan berat piknometer berisi minyak atsiri daun dan batang nilam dengan berat piknometer kosong.

Analisa Komponen Minyak Atsiri Nilam dengan KG-SM

Penentuan komponen minyak atsiri yang diperoleh dari daun dan batang nilam dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA UGM dengan menggunakan seperangkat alat kromatografi gas spektrometer massa (KG-SM) model Shimadzu QP 2010S.

Kondisi analisis adalah jenis kolom Agilent %W DB-1, panjang kolom 30 meter, diameter kolom 0,25 mm, suhu injektor 310-°C, tekanan 13,7 kPa, gas pembawa Helium dengan laju alir 0,50 ml/menit. Suhu kolom terprogram (*Temperatur programming*) dengan suhu awal 70°C selama 5 menit, lalu dinaikkan perlahan-lahan dengan *rate* kenaikan 5,0°C/menit sampai mencapai suhu akhir 260°C dan dipertahankan. Hasil pemisahan oleh KG langsung dianalisa dengan SM dengan cara membandingkan spektra fragmentasi minyak nilam dengan spektra fragmentasi standar yang terdapat dalam memori.

Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan larutan uji minyak atsiri daun dan batang nilam dengan konsentrasi 50 % sebagai larutan induk, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 40%, 30%, 20%, dan 10%. Pengenceran minyak atsiri daun dan batang nilam menggunakan tween 80 2% dan aquadest.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang disterilkan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan, untuk alat-alat gelas (tabung reaksi, erlemayer, dan pipet) ditutup mulutnya dengan sumbat kapas dan dibungkus dengan kertas perkamen, begitu juga dengan cawan petri dan corong. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Pinset, jarum ose, dan kaca objek disterilkan dengan cara pemijaran dengan jalan melewatkan pada nyala api selama 20 detik (Sepetro, 1998)

Pembuatan Medium Nutrient Agar

Sebanyak 23 gram serbuk *nutrient agar* (siap pakai) dilarutkan dalam 1 liter air suling dan dipanaskan sampai mendidih sambil sesekali diaduk hingga homogen, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Media nutrien agar dituangkan sebanyak 10 ml kedalam cawan petri dan 5 ml ke dalam tabung reaksi untuk agar miring, biarkan memadat dan simpan dalam lemari pendingin (Alex *et al*, 1980).

Pembuatan Medium Potato Dextrose Agar

Timbang sebanyak 39 gram serbuk *potato dextrose agar* dilarutkan dalam 1 liter air suling dan dipanaskan sampai mendidih dan dilarutkan seluruhnya. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan tekan 15 lbs selama 15 menit. Media *potato dextrose agar* dituangkan sebanyak 10 ml kedalam cawan petri dan 5 ml kedalam tabung reaksi untuk agar miring, biarkan memadat dan simpan dalam lemari pendingin (Alex *et al*, 1980).

Peremajaan Mikroba uji

Mikroba yang telah dimurnikan diinokulasi dengan bantuan jarum ose ke media agar miring, kemudian diinkubasi pada suhu 34°C selama 48 jam untuk bakteri dan pada suhu 25-27 °C selama 3 sampai 5 hari untuk jamur hingga diperoleh pertumbuhan yang normal (Jawetz *et al*, 1989).

Pembuatan Suspensi Mikroba Uji

Ambil koloni dari agar miring nutrisi agar dan *potato dextrose agar* menggunakan jarum ose kemudian disuspensikan ke dalam pelarut NaCl 0,9% dalam kuvet dan kocok homogen. Kekeruhan suspensi mikroba uji diukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis yaitu λ 580 nm dengan transmitansi 25% untuk bakteri dan pada λ 530 dengan transmitansi 90% untuk jamur (Suriawiria, 1995).

Uji Penghambatan Pertumbuhan Mikroba

Teteskan suspensi bakteri sebanyak 2 tetes ke tabung reaksi yang berisi 10 ml media agar lalu homogenkan kemudian tuangkan di atas cawan petri yang berisi 10 ml media agar yang telah memadat, lalu ratakan. Cawan petri tersebut digoyangkan beberapa kali secara horizontal agar suspensi mikroba ini merata pada seluruh permukaan agar. Kemudian dibiarkan pada suhu kamar selama 15 menit (Alek *et al*, 1980). Setiap mikroba uji ditempatkan pada 3 cawan petri untuk tiap larutan uji dan pengujian dilakukan sebanyak tiga kali (triplo).

Cakram kertas yang telah disterilkan dicelupkan ke dalam masing-masing konsentrasi zat uji yang telah disiapkan kemudian diletakkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan mikroba. Cawan petri nutrisi agar diinkubasi ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam, sedangkan *potato dextrose agar* pada suhu 25°C selama 5 hari. Kemudian diukur diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil analisis minyak atsiri daun dan batang nilam dengan menggunakan pemisahan kromatografi gas terdapat 10 puncak yang dianalisis dengan metoda spektrometri massa hasil analisis menunjukkan komponen utama yaitu : patchouli alkohol (48,06%), δ guaiene (18,24%), α guaiene (13,14%), α patchoulene (6,49%), seychellene (5,85%), β

caryophyllene (3,01%), azulene (2,66%), β patchoulene (1,24%), β elemene (0,96%), α humulene (0,34%). Hasil pengamatan uji aktivitas antimikroba dari minyak atsiri daun dan batang nilam (*Pogostemon cablin* Benth) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 pada konsentrasi 50%, 40%, 30%, 20%, 10% tidak menunjukkan adanya diameter zona hambat. Diameter hambat terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 pada konsentrasi 50%, 40%, 30%, 20%, dan 10% diameter hambatnya berturut-turut sebesar 19,2 mm, 18,4 mm, 17,1 mm, 15,1 mm, dan 12,0 mm. Terhadap jamur *Candida albicans* ATCC 01231 pada konsentrasi 50%, 40%, 30%, 20%, dan 10% tidak menunjukkan adanya diameter zona hambat. Hasil penentuan konsentrasi hambat minimum dari minyak atsiri daun dan batang nilam (*Pogostemon cablin* Benth) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 diambil dari konsentrasi 10% (sebanding dengan 100.000 ppm) yang diencerkan menjadi konsentrasi 10.000 ppm, 1000 ppm dan 100 ppm diameter zona hambatnya 9,2 mm, 7,1 mm dan 6,6 mm.

Pembahasan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa daun dan batang nilam yang sudah dirajang dan dikeringkan, pemilihan sampel kering tersebut bertujuan untuk mengurangi kandungan air yang terdapat pada sampel sehingga minyak atsiri nilam lebih mudah keluar dari dalam sampel (Guenther, 2006).

Dari hasil destilasi diperoleh minyak atsiri daun dan batang nilam sebanyak 25 ml, dan dikarakterisasi komponen senyawanya menggunakan metoda kromatografi gas spektrometri massa. Sebagian minyak atsiri daun dan batang nilam dilakukan uji aktivitas antimikroba dengan menggunakan metode difusi agar. Sebagai mikroba uji digunakan bakteri *Streptococcus mutans* (ATCC 31987), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) dan *Candida albicans* (ATCC 01231). Hasil uji aktivitas dari minyak atsiri daun terhadap bakteri dan batang nilam tidak memperlihatkan aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* (ATCC 31987), dengan

tidak ditandai adanya diameter zona hambat. Hal ini kemungkinan disebabkan karena bakteri ini merupakan bakteri gram positif yang mempunyai struktur dinding sel yang tebal sehingga mempunyai ketahanan yang baik terhadap senyawa antibakteri, selain itu bakteri *Streptococcus mutans* menghasilkan dua enzim yaitu *glucosyl transferase* dan *fruktosyl transferase*. Enzim-enzim ini bersifat spesifik untuk substrat sukrosa yang digunakan untuk sintesa glukosa dan fruktosa atau levan, koloni *Streptococcus mutans* yang ditutupi oleh glukosa diduga dapat menurunkan proteksi dan daya antibakteri dari minyak atsiri daun dan batang nilam (Regina, 2007).

Hasil uji aktivitas terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) dari minyak atsiri nilam dengan konsentrasi 50%, 40%, 30%, 20% dan 10% diameter hambatnya berturut-turut sebesar 19,2 mm, 18,4 mm, 17,1 mm, 15,1 mm dan 12,0 mm. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa daya hambat terbesar dimiliki oleh minyak atsiri nilam dengan konsentrasi 50 %. Karena pada konsentrasi terkecil (10 %) masih menunjukkan adanya *clear zone* maka dilakukan pengujian konsentrasi hambat minimum terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Konsentrasi 10 % sebanding dengan 100.000 ppm, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 10.000 ppm, 1000 ppm dan 100 ppm. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Diameter hambat yang terbentuk pada konsentrasi 10.000 ppm, 1000 ppm dan 100 ppm berturut-turut sebesar 9,2 mm, 7,1 mm dan 6,6 mm.

Data ini memperlihatkan tingginya aktivitas antibakteri minyak atsiri dari daun dan batang nilam terhadap bakteri

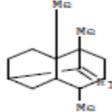
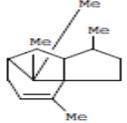
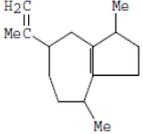
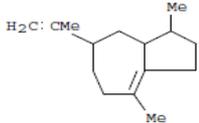
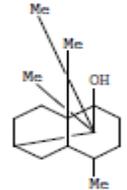
Pseudomonas aeruginosa dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) 100 ppm sebesar 6,6 mm. Aktivitas antibakteri tersebut diduga berasal dari senyawa-senyawa golongan terpen seperti seychellene, α guaiene dan kandungan utamanya yaitu patchouli alkohol yang mempunyai aktivitas antibakteri. Minyak atsiri dari komponen terpen yang terkandung dalam suatu tanaman dapat merusak membran sel melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen, pada kadar rendah ikatan lemah dan segera mengalami penguraian, diikuti penetrasi ke dalam sel yang menyebabkan denaturasi protein dan pada kadar tinggi menyebabkan koagulasi protein dan sel mengalami lisis (Parwata, 2008).

Hasil pengamatan diameter hambat terhadap *Candida albicans* (ATCC 01231) dari minyak atsiri nilam dengan konsentrasi 50%, 40%, 30%, 20% dan 10% tidak memperlihatkan aktivitas antimikroba dengan tidak ditandai adanya diameter zona hambat. Hal ini menunjukkan minyak atsiri daun dan batang nilam tidak memiliki aktivitas sebagai antijamur.

Hasil analisa komponen minyak atsiri daun dan batang nilam menggunakan metode GC-MS menunjukkan bahwa minyak atsiri nilam terdapat 10 puncak yaitu : patchouli alkohol (48,06%), δ guaiene (18,24%), α guaiene (13,14%), α patchoulene (6,49%), seychellene (5,85%), β caryophyllene (3,01%), azulene (2,66%), β patchoulene (1,24%), β elemene (0,96%), α humulene (0,34%).

Adapun struktur kimia dari 5 komponen terbesar yang terdapat dalam kandungan minyak atsiri daun dan batang nilam serta pola fragmentasi dari senyawa-senyawa tersebut diuraikan seperti dibawah ini.

Tabel 1 .Hasil analisis KG-SM 5 komponen terbesar minyak atsiri nilam

No	Nama Senyawa	Kandungan (%)	Waktu tambat (Rt)	Rumus Molekul	Struktur kimia
1	Seychellene	5,85	23.259	C ₁₅ H ₂₄	
2	Alpha patchoulene	6,49	23.696	C ₁₅ H ₂₄	
3	Alpha guaiene	13,14	23.140	C ₁₅ H ₂₄	
4	Deltha guaiene	18.24	24.875	C ₁₅ H ₂₄	
5	Patchouli alkohol	48.06	28.684	C ₁₅ H ₂₆ O	

Spektrum MS senyawa seychellen (Lampiran 9, gambar 12.a) menunjukkan ion molekul pada m/e 204 mengalami fragmentasi yang melepaskan C₂H₅ (m/e 29) membentuk fragmen dengan puncak m/e 175. Ion pada m/e 175 mengalami fragmentasi yang melepaskan C₃H₆ (m/e 42) membentuk fragmen dengan puncak m/e 133. Ion pada m/e 133 mengalami fragmentasi yang melepaskan C₂H₂ (m/e 26) membentuk puncak m/e 107. Ion pada m/e 107 mengalami fragmentasi yang melepaskan CH₂ (m/e 14) membentuk fragmen dengan puncak m/e 93. Ion pada m/e 93 mengalami fragmentasi yang melepaskan C₃H₂

(m/e 38) membentuk fragmen dengan puncak m/e 55.

SIMPULAN

Hasil karakterisasi minyak atsiri daun dan batang nilam (*Pogostemon Cablin* Benth) dengan metoda GC-MS terdapat 10 puncak yaitu patchouli alkohol (48,06%), δ guaiene (18,24%), α guaiene (13,14%), α patchoulene (6,49%), seychellene (5,85%), β caryophyllene (3,01%), azulene (2,66%), β patchoulene (1,24%), β elemene (0,96%), dan α humulene (0,34%). Semua konsentrasi minyak atsiri nilam memiliki aktivitas sebagai

antimikroba terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 dengan diameter hambat terbesar dimiliki minyak atsiri nilam pada konsentrasi 50 % yaitu 19,2 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, Y., Pudji, H., Hardjono, S. (2008). Komposisi kimia dan sifat antibakteri minyak nilam (*Pogostemon cablin* Benth). *Majalah Farmasi Indonesia*, 19(3), 151-156.
- Alex, C.S, W. & L, Jarets. (1980). *Grod whol's :Clinical laboratory methods and diagnosis. (volume 2)*. London :CV . Mosby campany ST . Louis Toronto.
- Cappuccino, J.G. & Sherman, N. (1987). *Microbiology: a laboratory manual*. California : The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Dachriyanus. (2004). *Analisis struktur senyawa organik secara spektroskopi*. Padang : Universitas Andalas Padang.
- Djamal, R.. (2009). *Kimia bahan alam : prinsip-prinsip dasar isolasi dan identifikasi*. Padang : Universitas Baiturrahmah.
- Dzakwan, M.. (2012). Uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun nilam (*pogostemon cablin* benth) terhadap *staphylococcus aureus* dan *eschericia coli*. *Jurnal Biomedika*.
- Febrianti, Anis & Yulfi Zetra. (2011). Minyak atsiri tanaman nilam (*pogostemon cablin* benth) melalui metode pengeringan langsung dan hidrodistilasi serta uji bioaktivitasnya. Prosiding Tugas akhir Semester Genap diterbitkan, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Guenther, E. (2006). *Minyak Atsiri*. (Jilid I), diterjemahkan oleh S. Ketaren .Jakarta : penerbit Universitas Indonesia.
- Heyne, K. (1987). *Tumbuhan berguna indonesia*. (Jilid III. Cetakan ke-1), diterjemahkan oleh Badan Litbang Departemen Kehutanan, Jakarta.
- Kiuchi, F., Matsuo, K., Ito, M., Qui, T.K., & Honda, G. (2004). New sesquiterpan hydroperoxides with trypanocidal activity from *pogostemon cablin*. *J. Che. Pharn. Bull.*
- Kusumaningtyas, Eni. (2008). Sensitifitas metode bioautografi kontak dan *agar overlay* dalam penentuan senyawa antikapang. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 6, 75-76.
- Lay, Bibiana W. (1994). *Analisa Mikroorganisme* dilaboratorium. Jakarta :Raja Grafindo Persasa.
- Parwata, I.M.O. Adi & P.F.S. Dewi. (2008). Isolasi dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dari rimpang lengkuas (*alpinia galanga* l.). *Jurnal Kimia*, 2(2), 100-104.
- Sidarningsih. (2000). Kadar antibodi ig a sekretori terhadap antigen I/II *streptococcus mutans* dalam saliva subyek bebas karies dan karies aktif. *J.Dent*, 33(3), 99-102.
- Sonwa, M.M.. (2001). *Isolation and structure elucidation of essential oil constituents: comparative study of the oils of cyperus alopecuroides, cyperus papyrus and cyperus rptundus*. *Hamburg:2000*. Dissertation for the fulfillment of the requirements for the degree of doctor from Mbamougong Cameroon.

- Todar, K. (2008). *The control of microbial growth*. Wincosin : University of Wincosin.
- Volk, W.A., dan M. F, Wheeler. (1990) *Mikrobiologi Dasar*, Edisi V, Jilid 1 diterjemahkan oleh : Adisumartono,S. Jakarta. Erlangga.
- Wijayakusuma, K.M.H., Dalimarta, S., Yaputra Thomas, & Wibawa Bambang. (1992). *Tanaman berkhasiat obat indonesia*. (Jilid 1).Jakarta : Pusta.