

Antibacterial Activity of Ethanol Extract from Stem Bark and Leaves of Berenuk (*Crescentia cujete* L.)

(Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang dan Daun Berenuk (*Crescentia cujete* L.))
Uswatun Hasanah¹, Desi Rosdiana², Syaefudin^{2*}

¹*Department of Food Science and Technology, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia*

²*Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia*

Corresponding author: Syaefudin; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; E-mail: syaefudin01@apps.ipb.ac.id

ABSTRACT

Crescentia cujete L. (*C. cujete*) has been known as a medicine for various diseases that caused by microorganisms. This research was aimed to identify the phytochemical compounds and to determine the antibacterial activity of ethanolic extracts from stem bark and leaves of *C. cujete*. The phytochemical compounds in both extracts were identified by Harborne method, while antibacterial activity assay was performed by disc diffusion method with the concentration of bacteria 10^6 cfu/mL. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) were used in antibacterial assay. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was obtained by using contact method. The phytochemical compounds analysis showed that ethanol extracts of *C. cujete* stem bark and leaves contained alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, and steroids. The results of antibacterial activity test showed that both extracts have antibacterial activity with the highest inhibition showed by extracts with concentration of 100 % (w/v). The decreased percentage in the number of bacterial colonies on the extracts was less than 90 % so that the MIC value of both extracts against *S. aureus* could not be determined.

Keywords: antibacterial, *Crescentia cujete*, ethanol extract, leaves, stem bark

ABSTRAK

Berenuk (*Crescentia cujete* L.) telah dikenal sebagai obat untuk menangani beberapa penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi senyawa fitokimia serta menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk. Senyawa fitokimia diidentifikasi dengan metode Harborne, sedangkan aktivitas antibakteri ditentukan melalui metode difusi cakram dengan konsentrasi bakteri 10^6 cfu/mL. Bakteri yang digunakan adalah Sta-

phylococcus aureus (*S. aureus*) dan *Escherichia coli* (*E. coli*). Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) menggunakan metode kontak. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa kedua ekstrak memiliki aktivitas antibakteri dengan penghambatan terbesar ditunjukkan oleh ekstrak dengan konsentrasi 100 % (b/v). Persentase penurunan jumlah koloni bakteri pada kedua ekstrak kurang dari 90 % sehingga KHM kedua ekstrak terhadap *S. aureus* tidak dapat ditentukan.

Kata kunci: antibakteri, batang, *Crescentia cujete*, daun, ekstrak etanol

1. PENDAHULUAN

Berenuk (*Crescentia cujete* L.) telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional, baik bagian daging buah, daun, kulit batang, maupun akarnya. Daging buah berenuk biasanya digunakan masyarakat untuk mengobati diare, sakit perut, flu, bronkitis, batuk, asma, uretritis, ekspektoran, antitusif, dan pencahar (Kaneko *et al.* 1998; Parvin *et al.* 2015). Meski demikian, Alay-ay *et al.* (2016) melaporkan bahwa jus buah berenuk memiliki efek hipoglikemia pada tikus normal. Daun berenuk digunakan untuk mengobati luka baru, sakit kepala, hipertensi, hematoma, dan tumor. Kulit batang berenuk dapat digunakan untuk membersihkan luka dan mengobati diare berlendir (Parvin *et al.* 2015). Berenuk juga banyak dijadikan tanaman hias ataupun peneduh jalan yang tumbuh liar. Berenuk juga berkhasiat membunuh caplak sapi (*Rhipicephalus microplus*) dan ulat grayak (*Spodoptera litura*) (Pareira *et al.* 2017, Safirah *et al.* 2016).

Tanaman berenuk mengandung beberapa senyawa utama, antara lain: asam tartarat, asam sitrat, tanin, β -sitosterol, estigmastrol, α dan β amirina, asam stearat, triakontanol, asam palmitat, quersetin, apigenin, dan minyak esensial golongan diterpena (Kaneko *et al.*

1998, Ogbuagu 2008, Dawodu *et al.* 2016). Buah berenuk mengandung alkaloid, flavonoid, fitosterol, tanin, dan saponin (Pasicolan *et al.* 2014, Billacura & Laciapag 2017). Adapun daun berenuk terdeteksi memiliki senyawa naftokuinon, glikosida iridoid, dan aukubin (Agarwal & Popli 1992, Heltzel *et al.* 1993).

Parvin *et al.* (2015) melakukan uji antibakteri ekstrak etanol dan fraksi kloroform kulit batang dan daun berenuk yang diperoleh dari Bangladesh, namun aktivitas penghambatan tertinggi hanya ditunjukkan pada *E. coli* dengan zona inhibisi 29 mm setara dengan standar kanamisin 30 μ g pada fraksi kloroform daun berenuk. Rinawati (2011) juga melakukan uji antibakteri ekstrak kulit batang segar dan kering serta daun segar dan kering, namun zona hambat terbesar hanya dihasilkan pada ekstrak daun segar yaitu 19.8 mm terhadap *Vibrio alginolyticus*. Beberapa penelitian sebelumnya telah banyak menggunakan ekstrak daun dan kulit batang, namun zona hambat yang dihasilkan tergolong lemah hingga sedang terutama pada kulit batang. Selain itu, informasi aktivitas antibakteri kulit batang dan daun berenuk asal Indonesia masih terbatas pada *Vibrio alginolyticus* dan sumber tanaman yang masih segar. Padahal, pada taraf penggunaan obat (khususnya jamu) jangka panjang di masyarakat biasanya digunakan

dalam bentuk sediaan simplisia. Oleh sebab itu, perlu diteliti aktivitas antibakteri kulit batang dan daun berenek yang sudah merupakan simplisia kering serta menggunakan isolat mikroba yang berbeda.

Mikroba yang digunakan dalam penelitian adalah *S. aureus* dan *E. coli*. *S. aureus* adalah bakteri patogen Gram positif yang merupakan flora normal pada kulit, mulut, dan saluran pernapasan bagian atas. *S. aureus* dapat menyebabkan infeksi paru-paru, radang selaput otak, radang tulang, sinusitis, radang amandel, sepsis, dan infeksi kulit serta saluran pencernaan (Fritz *et al.* 2013, Otto 2014). Adapun *E. Coli* merupakan bakteri patogen Gram negatif yang umumnya menghuni usus manusia dan dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, diare, infeksi saluran kencing, dan sindrom *haemolytic uraemia* (Ulett *et al.* 2013, Luna-Gierke *et al.* 2014). Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi metabolit sekunder dan menentukan aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit batang serta daun berenek. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kandungan fitokimia kulit batang dan daun berenek (*Crescentia cujete* L.) serta potensi dan aktivitasnya sebagai antibakteri.

2. METODOLOGI

Biakan *E. coli* dan *S. aureus* tipe liar didapatkan dari Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor. Adapun sampel berenek (*Crescentia cujete* L.) diperoleh dari perkebunan masyarakat di Kabupaten Bogor, Jawa Barat (6°33' 17"S/106°42'3"E) yang telah berusia 4 tahun. Berenek diidentifikasi oleh Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

(PPB-LIPI), Bogor. Sampel kulit batang diambil mulai dari kulit terluar hingga bagian sebelum kambium, sedangkan sampel daun yang diambil yaitu daun setelah helai ke-6 dari pucuk. Kulit batang dan daun berenek yang masih segar masing-masing sebanyak 2 Kg dan 4 Kg dicuci menggunakan air mengalir, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40-50 °C sampai kering dan mencapai berat yang konstan. Masing-masing sampel kemudian dihaluskan menggunakan mesin penggiling dengan penyaring 100 mesh hingga diperoleh simplisia serbuk.

Simplisia yang didapatkan ditentukan kadar airnya dengan menggunakan metode AOAC (2007). Cawan porselen dicuci bersih dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C selama 45 menit. Selanjutnya, cawan didinginkan dalam desikator selama 30 menit, kemudian ditimbang bobot kosongnya. Simplisia serbuk kulit batang berenek dimasukkan ke dalam cawan sebanyak 2 g dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 105 °C selama 3 jam. Cawan beserta isinya diangkat, lalu didinginkan dalam desikator selama 30 menit. Proses pengeringan dihentikan bila diperoleh bobot serbuk yang konstan. Penentuan kadar air dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Tahapan yang sama juga dilakukan dengan menggunakan simplisia serbuk daun berenek. Kadar air dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{B - (A - C)}{B} \times 100 \%$$

Keterangan:

A = Bobot cawan dan sampel setelah dikeringkan (g)

B = Bobot sampel awal (g)

C = Bobot cawan kosong (g)

Simplisia kulit batang dan daun berenuk diekstraksi dengan metode yang diatur oleh BPOM (2004). Simplisia serbuk kulit batang berenuk sebanyak 50 g dimaserasi dengan 500 mL etanol 70 % menggunakan inkubator bergoyang dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah itu, residu yang diperoleh dimaserasi kembali. Maserasi dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan. Semua maserat dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotavapor pada suhu 60 °C. Bobot ekstrak kering yang diperoleh kemudian ditimbang. Tahapan ini juga dilakukan untuk simplisia serbuk daun berenuk. Kadar rendemen dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen Ekstrak (\%)} = \frac{A}{B - (B \times C)} \times 100 \%$$

Keterangan:

A = Bobot ekstrak (g)

B = Bobot simplisia (g)

C = Kadar air

Sebagian ekstrak etanol yang diperoleh ditapis profil senyawa fitokimianya dengan metode yang dikembangkan oleh Harborne (2006). Uji fitokimia yang dilakukan secara kualitatif pada penelitian ini adalah uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid, dan steroid. Uji positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih kekuningan (dengan pereaksi Meyer), merah atau jingga (dengan pereaksi Dragendorf), atau putih kekuningan (dengan pereaksi Wagner). Simplisia daun tapak dara digunakan sebagai kontrol positif pada uji alkaloid (Zhu et al. 2015). Adapun uji flavonoid diidentifikasi dengan terbentuknya warna merah pada filtrat uji. Simplisia daun sirih merah digunakan

sebagai kontrol positif pada uji flavonoid (Safithri et al. 2016, Syaefudin et al. 2016). Uji saponin ditandai dengan stabilnya buih yang terbentuk pada filtrat uji bila dikocok. Simplisia biji lerak digunakan sebagai kontrol positif pada uji saponin (Hamburger et al. 1992). Warna biru tua atau hitam yang terbentuk pada uji fitokimia menunjukkan bahwa filtrat positif mengandung tanin. Simplisia daun teh digunakan sebagai kontrol positif pada uji tannin (Savolainen 1992). Adapun uji triterpenoid dan steroid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau ungu untuk triterpenoid dan hijau atau biru untuk steroid. Simplisia som jawa digunakan sebagai kontrol positif pada uji steroid (Ramos et al. 2010).

Ekstrak etanol diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi cakram (Natta et al. 2008). Sebanyak 0.1 mL suspensi yang mengandung $\pm 10^6$ cfu/mL bakteri disebar di atas media padat *Nutrient Agar* (NA). Cakram berdiameter 5 mm yang telah dicampurkan ekstrak dengan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 % (b/v) serta kontrol positif (amoksisilin 0.05 % (b/v)) diletakkan pada permukaan media padat. Ekstrak 100 % (b/v) adalah ekstrak pekat. Kemudian, cawan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditentukan melalui ukuran zona bening yang terbentuk di sekeliling cakram menggunakan jangka sorong. Zona bening yang terbentuk dibandingkan dengan standar zona hambat pada Tabel 1. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak dua kali ulangan.

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan metode kontak (Kubo et al. 1992). Bakteri uji yang telah dikulturkan dalam media cair *Nutrient Broth* (NB) diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Tabel 1 Klasifikasi respon hambatan (Greenwood 1989)

Diameter zona bening (mm)	Respon hambatan pertumbuhan
≤ 10	Kurang efektif
11 – 15	Lemah
16 – 20	Sedang
>20	Kuat

Ekstrak dikontakkan dengan larutan pengencer NB dan bakteri uji. Seri konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 15, 20, dan 25 % (b/v) dengan volume total 1.2 mL. Kekeuhan bakteri dalam media NB diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 620 nm. Kemudian, kombinasi perlakuan antara ekstrak, larutan pengencer NB, dan bakteri uji disiapkan dalam konsentrasi tertentu. Bakteri uji ($\pm 10^6$ cfu/mL) ditambahkan ke dalam vial yang berisi media cair NB dan ekstrak, lalu dihomogenkan. Komposisi ekstrak, media cair NB, serta bakteri dapat dilihat pada Tabel 2. Selanjutnya, sampel diinkubasi menggunakan inkubator bergoyang pada suhu 37 °C selama 24 jam. Sampel pada setiap perlakuan diencerkan hingga pengenceran 10^{-8} . Tiga seri pengenceran terakhir ditumbuhkan dengan metode tuang menggunakan media NA, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh pada setiap cawan setelah 24 jam dihitung. Konsentrasi hambat minimum (KHM)

ditentukan berdasarkan konsentrasi terkecil dari setiap ekstrak yang dapat menghambat 90 % pertumbuhan bakteri uji atau menurunkan satu fase log (Cosentino *et al.* 1999).

Data yang diperoleh diolah menggunakan program SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data tersebut dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) pada taraf $\alpha=0.05$. Jika terdapat perbedaan nyata ($p<0.05$) analisis lanjut dilakukan dengan uji Duncan.

3. HASIL

Kadar air dan rendemen kulit batang dan daun berenuk

Penetapan kadar air serta rendemen kulit batang dan daun berenuk dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa simplisia kulit batang memiliki kandungan air yang lebih sedikit dibandingkan dengan simplisia daun. Meski demikian ekstrak kulit batang memiliki nilai rendemen yang lebih tinggi. Rendemen ekstrak etanol kulit batang berenuk yang dihasilkan adalah 18.09% (b/b), sedangkan rendemen ekstrak etanol daun berenuk sebesar 7.94% (b/b).

Komponen fitokimia ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa kulit batang dan daun berenuk mengandung

Tabel 2 Komposisi ekstrak, media cair NB, dan bakteri uji pada penentuan KHM metode kontak

Konsentrasi ekstrak (% b/v)	Jumlah ekstrak (mL)	Jumlah media cair NB (mL)	Jumlah bakteri uji (mL)
0	-	1.00	0.20
15	0.18	0.82	0.20
20	0.24	0.76	0.20
25	0.30	0.70	0.20

Tabel 4 Senyawa fitokimia ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk

Uji	Ekstrak		Kontrol positif
	Kulit batang	Daun	
Alkaloid			
Dragendorff	+++	+++	+++
Meyer	++	++	+++
Wagner	+++	+++	+++
Flavonoid	+	+	+++
Saponin	+++	+++	++
Tanin	++	++	+++
Triterpenoid	-	-	+
Steroid	+	+	+

Keterangan:

(-) tidak mengandung metabolit sekunder

(+) mengandung metabolit sekunder, intensitas ditunjukkan dengan jumlah tanda + yang lebih banyak

metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan steroid (Tabel 4). Kedua ekstrak tidak ditemukan senyawa triterpenoid.

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk

Aktivitas antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening pada sekitar cakram

di media yang sudah ditumbuhkan bakteri dan diberi ekstrak dengan konsentrasi tertentu. Zona bening yang terbentuk menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan mikroba oleh senyawa antimikroba yang terdapat dalam ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* maupun

Tabel 5 Diameter zona bening ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk

Sampel	Konsentrasi (%) (b/v)	Diameter zona bening (mm)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Kulit batang	20	1.50	1.25
	40	1.50	1.75
	60	1.55	1.88
	80	1.70	2.00
	100	1.75	2.12
Daun	20	1.00	1.00
	40	1.50	1.88
	60	1.75	2.12
	80	2.38	3.50
	100	2.95	4.00
Kontrol positif	Amoksisilin 0.05	8.62	14.25
Kontrol negatif	Akuades	-	-

Keterangan: (-): tidak terdapat zona hambat

Tabel 6 Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk

Ekstrak	Konsentrasi ekstrak (%)	Σ koloni bakteri setelah kontak (cfu/mL)	Penurunan Σ koloni bakteri (%)
Kulit batang	15	$< 2.5 \times 10^7 (1.5 \times 10^6)$	68.75
	20	$< 2.5 \times 10^7 (1.3 \times 10^6)$	72.92
	25	$< 2.5 \times 10^7 (1.0 \times 10^6)$	79.17
Daun	15	$< 1.0 \times 10^6$	79.17
	20	$< 1.0 \times 10^6$	79.17
	25	$< 1.0 \times 10^6$	79.17

S. aureus (Tabel 5). Daya hambat pertumbuhan bakteri sebanding dengan konsentrasi kedua ekstrak. Meski demikian, aktivitas antibakteri ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk ini masih lemah. Hal ini bisa terlihat jika dibandingkan dengan aktivitas antibakteri kontrol positif, yakni amoksisilin 0.05 %. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk memiliki aktivitas penghambatan yang lebih besar terhadap *S. aureus* dibandingkan terhadap *E. coli*.

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk terhadap *S. aureus*

Nilai KHM ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk terhadap *S. aureus* dengan pengencer NB dapat dilihat pada Tabel 6. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa jumlah koloni yang terdapat pada ekstrak etanol kulit batang dengan konsentrasi 15 % (b/v) lebih banyak dibanding ekstrak etanol kulit batang dengan konsentrasi 25 % (b/v). Hasil pengamatan juga memperlihatkan bahwa jumlah koloni bakteri pada tiga seri konsentrasi ekstrak etanol kulit batang lebih banyak dibandingkan dengan jumlah koloni bakteri pada tiga seri konsentrasi ekstrak etanol daun berenuk. Hasil pengamatan

menunjukkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri pada kedua ekstrak kurang dari 90 %.

4. PEMBAHASAN

Kandungan air pada simplisia kulit batang lebih tinggi dibandingkan dengan simplisia daun berenuk. Kandungan air tersebut menggambarkan perbandingan berat air bebas yang terikat pada membran matriks sel tanaman dengan air yang menguap akibat pengeringan. Pengeringan sampel bertujuan mengurangi kandungan air yang terdapat dalam sampel sehingga dapat memperlama masa simpan bahan. Pengeringan dapat menurunkan kadar air, namun tidak berpengaruh terhadap kandungan beberapa metabolit sekunder tidak tahan panas (Sutjipto *et al.* 2009, Setiafianti *et al.* 2017). Perbedaan jenis dan metode pengeringan juga dapat memengaruhi mutu simplisia secara keseluruhan, namun masih dalam batas yang diperbolehkan oleh Famakope Herbal Indonesia (Wahyuni *et al.* 2014, Manoi 2015).

Pengukuran kandungan air yang terdapat dalam suatu bahan dapat dilakukan dengan metode titrasi, destilasi, atau gravimetri. Pengukuran ini bertujuan memberikan batasan minimal atau rentang besarnya kandungan air dalam bahan dan berkaitan erat dengan

kemurnian bahan dan kontaminasi (Ditjen POM 2000). Penelitian ini menggunakan metode gravimetri untuk menentukan kadar air karena simplisia yang diteliti berupa serbuk atau padatan. Kadar air menggambarkan kandungan air yang masih dimiliki oleh simplisia dan akan sangat menentukan saat penyimpanan. Kadar air yang lebih tinggi memudahkan mikroorganisme untuk hidup sehingga mampu merusak simplisia selama disimpan.

Di sisi lain, rendemen ekstrak diperoleh dari ekstraksi simplisia kulit batang dan daun berenuk dengan etanol 70 % (v/v). Penelitian menunjukkan bahwa rendemen ekstrak etanol kulit batang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol daun berenuk. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung dalam simplisia kulit batang lebih banyak terekstrak daripada simplisia daun dengan pelarut etanol 70 % (v/v) (Sani *et al.* 2014). Hasil ini berbeda dengan laporan Nurhasanah *et al.* (2014) serta Kusuma dan Sulitoyo (2014) yang menyatakan bahwa rendemen ekstrak daun berenuk berturut-turut sebesar 12.8 % (b/b) dan 4.08 % (b/b). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan asal tanaman serta pelarut yang digunakan. Faktor fisik dan lingkungan daerah penanaman berenuk memengaruhi profil metabolit yang dihasilkan. Profil metabolit yang beragam dapat meningkatkan perbedaan daya ekstraksi pelarut serta kemampuan terlarut keseluruhan metabolit pada tanaman dalam pelarut.

Deteksi kandungan metabolit sekunder pada ekstrak dilakukan dengan uji fitokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kulit batang dan daun berenuk mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan steroid. Meski demikian, pada kedua ekstrak

tidak ditemukan senyawa triterpenoid. Hasil ini sedikit berbeda dengan yang dilaporkan Erwin *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa ekstrak methanol berenuk mengandung triterpenoid, namun tidak ditemukan flavonoid dan tannin. Penelitian lain menunjukkan bahwa daun dan kulit batang berenuk mengandung alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, alkaloid, tanin, glikosida, dan terpen (Edeoga *et al.* 2005, Das *et al.* 2014). Perbedaan kandungan metabolit sekunder tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan asal tanaman, letak geografis, umur tanaman, dan proses ekstraksi (Kusumaningtyas *et al.* 2008). Perbedaan senyawa fitokimia yang terdeteksi juga dapat disebabkan oleh ukuran partikel serbuk simplisia yang diekstrak. Sebagai contoh, Sembiring dan Suhirman (2014) melaporkan bahwa ukuran partikel simplisia yang lebih kecil akan memperbesar kandungan flavonoid yang terekstrak. Meski demikian, secara kualitatif hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua ekstrak memiliki intensitas senyawa fitokimia yang sama.

Senyawa fitokimia tersebut sangat penting bagi kemampuan aktivitas biologis ekstrak tanaman. Sebagai contoh, flavonoid memiliki peranan dalam melindungi sel-sel manusia dari kerusakan radikal bebas (Syaefudin *et al.* 2014, Sulistiyani *et al.* 2014). Flavonoid juga dapat berperan sebagai antibakteri (Parvin *et al.* 2015). Saponin dikenal sebagai antibiotik alami dan antiradang (Ejelonu *et al.* 2011). Tanin berperan dalam penyembuhan luka pencegah infeksi bakteri (Ogbuagu 2008). Adapun steroid, khususnya senyawa α -spinasterol, berfungsi sebagai antinoniseptik (analgesik), antiinflamasi, antidematogenik (Freitas *et al.* 2009, Lee *et al.* 2012, Trevisan *et al.* 2012, Borges *et al.* 2014).

Penelitian ini menentukan juga bertu-

juan menentukan aktivitas biologis ekstrak berenuk dalam menghambat atau membunuh bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk memiliki aktivitas penghambatan yang lebih besar terhadap *S. aureus* dibandingkan terhadap *E. coli*. Hal ini mengindikasikan bahwa zona hambat yang terbentuk pada uji antibakteri juga dipengaruhi oleh jenis bakteri uji. *S. aureus* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki dinding sel tebal berlapis tunggal dengan kandungan lipid yang rendah. Adapun *E. coli*, yang dalam hal ini mewakili bakteri Gram negatif memiliki dinding sel tipis berlapis tiga dengan kandungan lipid yang tinggi (Kohanski *et al.* 2010; Silhavy *et al.* 2010). Dinding sel bakteri Gram negatif tersusun atas lipopolisakarida (LPS), fosfolipid, dan lipoprotein pada membran terluar yang mengandung porin. Kerusakan dinding sel dimulai dari LPS dan porin. Senyawa antibakteri bekerja dengan cara menembus LPS. Molekul yang bersifat hidrofilik akan mudah melewati LPS dibandingkan dengan molekul hidrofobik. Bakteri Gram positif tidak memiliki LPS sehingga molekul antibakteri yang bersifat hidrofilik dan hidrofobik akan mudah menembusnya (Tortora *et al.* 2007).

Rinawati (2011) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun segar berenuk memiliki penghambatan yang lebih besar pada *Vibrio alginolyticus* dibandingkan dengan ekstrak etanol daun kering, kulit batang segar, kulit batang kering, buah segar, dan buah kering. Mekanisme kerja antibakteri masing-masing senyawa metabolit sekunder berbeda-beda. Senyawa alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen (Harborne 2006). Nitrogen akan bereaksi dengan asam amino yang menyusun dinding sel dan

DNA bakteri sehingga keseimbangan genetik akan terganggu dan mengakibatkan kerusakan total pada sel (Kohanski *et al.* 2010, Silhavy *et al.* 2010).

Senyawa flavonoid merupakan salah satu golongan terbesar senyawa fenol. Senyawa ini memiliki gugus fungsional hidroksil (-OH) yang melekat pada cincin aromatik. Gugus hidroksil (-OH) pada senyawa fenol dapat menyebabkan tingginya keasaman pada permukaan membran plasma dari bakteri patogen yang dapat mengganggu H^+ yang diperlukan ATPase untuk sintesis ATP (Mahbub *et al.* 2011). Senyawa flavonoid merupakan zat antimikroba yang efektif terhadap berbagai macam mikroorganisme (Cowan 1999). Senyawa ini mampu membentuk kompleks antara protein yang dapat larut dan protein ekstraseluler dengan dinding sel bakteri. Kompleks tersebut menyebabkan terganggunya integrasi membran sel bakteri (Huang *et al.* 2015).

Senyawa saponin dapat membentuk kompleks dengan sterol yang terdapat pada membran sel sehingga menyebabkan kerusakan membran. Rusaknya membran sel mengakibatkan membran plasma pecah, sitoplasma keluar, transport zat terganggu, dan metabolisme terhambat sehingga pertumbuhan bakteri juga terhambat bahkan mati (Tortora *et al.* 2007). Senyawa tanin dapat mengkoagulasi dan mendenaturasi protein. Tanin yang berikatan dengan protein membentuk ion H^+ menyebabkan pH menjadi asam sehingga merusak protein. Kondisi asam menonaktifkan enzim yang terdapat pada bakteri sehingga metabolisme selnya terganggu dan bahkan rusak. Senyawa steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat impermeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga

menyebabkan integritas membran menurun, morfologi membran sel berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel rapuh dan lisis (Yani 2004).

Kontrol positif yang digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri yaitu amoksisilin yang merupakan turunan penisilin. Hasil pengujian menunjukkan bahwa amoksisilin memiliki zona penghambatan yang lebih besar pada *S. aureus* dibandingkan pada *E. coli*. Hal ini sesuai dengan Pelczar dan Chan (2007) yang memaparkan bahwa bakteri Gram positif pada umumnya lebih rentan terhadap antibiotik penisilin, sedangkan bakteri Gram negatif lebih rentan terhadap antibiotik seperti streptomisin. Hasil pengujian juga menunjukkan bahwa ekstrak kulit batang dan daun berenuk memiliki aktivitas penghambatan tidak lebih dari 10 mm. Hal ini menunjukkan bahwa kedua ekstrak memiliki respon hambat pertumbuhan yang kurang efektif jika dibandingkan dengan zona hambat kontrol positif dan bersifat bakteristatik.

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) dilakukan terhadap ekstrak batang dan daun berenuk. KHM merupakan konsentrasi terendah ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sebanyak 90 % dari inokulum awal setelah inkubasi 24 jam atau menurunkan 1 fase log (Cosentino *et al.* 1999). Bakteri uji yang digunakan pada tahap ini adalah *S. aureus*. Bakteri ini digunakan karena memiliki penghambatan yang lebih besar pada uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan sebelumnya dan efisiensi penggunaan ekstrak yang jumlahnya terbatas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin tinggi tingkat penghambatan sehingga jumlah

bakteri yang tumbuh semakin sedikit. Penelitian juga memperlihatkan bahwa nilai KHM kedua ekstrak belum dapat ditentukan. Persentase penurunan jumlah koloni bakteri ekstrak etanol kulit batang tertinggi dihasilkan pada konsentrasi 25 % (b/v) sebesar 79.17 %. Hal ini memungkinkan untuk merentangkan kembali konsentrasi ekstrak di atas 25 % (b/v). Angka pasti jumlah koloni bakteri setelah kontak tidak diperoleh pada ekstrak etanol daun berenuk karena tidak ada pertumbuhan koloni yang teramati pada tingkat pengenceran terendah yang dilakukan, yakni 10^{-6} . Hal ini menunjukkan konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol daun cenderung belum dapat ditentukan.

Jumlah koloni bakteri yang dihasilkan pada pencawanan tiga seri pengenceran terakhir menunjukkan taksiran jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Hal ini disebabkan oleh jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media berada di bawah kisaran jumlah bakteri yang umumnya dapat dihitung. Kisaran umum perhitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media yaitu 25-250 cfu/mL (Harmita & Radji 2008). Oleh karena itu, tingkat pengenceran dapat dikurangi. Pencawanan juga dapat dilakukan pada seri tingkat pengenceran yang lebih rendah agar jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media dapat dihitung sesuai kisaran yaitu 25-250 cfu/mL.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa nilai KHM ekstrak etanol daun segar majapahit terhadap pertumbuhan *V. alginolyticus* menggunakan metode dilusi sebesar 60 %, ditandai dengan larutan yang mulai jernih (Rinawati 2011). Nilai KHM ekstrak etanol daun berenuk terhadap *E. coli* ATCC 25922 sebesar 50 % dan *S. aureus* ATCC 29213 sebesar 25 % (Ardianti & Kusnadi 2014).

Fraksi n-heksana kulit batang berenuk memiliki nilai KHM terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* masing-masing sebesar 0.20 dan 0.10 mg/mL (Yani 2011).

Senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid. Ekstrak etanol kulit batang dan daun berenuk memiliki aktivitas penghambatan yang lebih besar terhadap *S. aureus*. Kedua ekstrak menghasilkan zona hambat terbesar pada konsentrasi 100 % (b/v). Persentase penurunan jumlah koloni bakteri pada kedua ekstrak kurang dari 90 % sehingga konsentrasi hambat minimum (KHM) kedua ekstrak belum dapat ditentukan.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Herbarium Bogoriense – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor atas bantuan identifikasi sampel tanaman *Crescentia cujete* L.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal K, Popli SP. 1992. The constituents of *Crescentia cujete* leaves. *Fitoterapia* 63(5):476.
- Alay-ay C, Hermoso A, Li R, Quinto M, Santos P, Tan I, Villa M, Cadiang R, Corpuz M. 2016. Hypoglycemic effect of *Crescentia cujete* Linn. (Bignoniaceae) fruit juice in normal Sprague-Dawley rats. *Planta Medica* 82(05): PB2. DOI: 10.1055/s-0036-1578650.
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2007. Official Methods of Analysis. Ed ke-18. Maryland (US): Association of Official Analytical Chemists.
- Ardianti A, Kusnadi J. 2014. Ekstraksi antibakteri dari daun berenuk (*Crescentia cujete* Linn.) menggunakan metode ultrasonik. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 2(2):28-35.
- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2004. Monografi Ekstrak Tumbuhan dan Obat Indonesia. Jakarta (ID): BPOM RI.
- Billacura MP, Laciapag GCR. 2017. Phytochemical screening, cytotoxicity, antioxidant, and anthelmintic property of various extract from *Crescentia cujete* Linn. fruit. *Science International* 29(2):31-35.
- Borges FRM, Silva MD, Cordova MM, Schambach TR, Pizzolatti MG, Santos ARS. 2014. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 151(1):144-150. DOI: 10.1016/j.jep.2013.10.009.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. 1999. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29(2):130-135. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1999.00605.x.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582.
- Das N, Islam ME, Jahan N, Islam MS, Khan A, Islam MR, Parvin MS. 2014. Antioxidant activities of ethanol extracts and fractionations of *Crescentia cujete* leaves and stem bark and the involvement of phenolic compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14:45-53. DOI: 10.1186/1472-6882-14-45.
- Dawodu OA, Lawal OA, Ogunwande IA, Giwa AA. 2016. Volatile constituents of *Crescentia cujete* L. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 4(4):1-3.
- [Ditjen POM] Direktorat Jendral Pengawas Obat dan Makanan. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta (ID): Departemen Kesehatan RI.

- Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO. 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 4(7):685-688.
- Ejelonu BC, Lasisi AA, Olaremu AG, Ejelonu OC. 2011. The chemical constituents of calabash (*Crescentia cujete*). *African Journal of Biotechnology* 10(84):19631-19636. DOI: 10.5897/AJB11.1518.
- Erwin, Saleh C, Purwitassari T. 2012. Uji hipoglikemik ekstrak metanol daun majapahit (*Crescentia cujete* (L.)) terhadap kadar glukosa darah mencit jantan. *Jurnal Kimia Mulawarman* 9(2): 50-55.
- Freitas CS, Baggio CH, Dos Santos AC, Mayer B, Twardowschy A, Luiz AP, Marcon R, Soldi C, Pizzolatti MG, Dos Santos EP, Marques MC, Santos ARC. 2009. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in mice. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 104(4):285-292. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2008.00367.x.
- Fritz SA, Tiemann KM, Hogan PG, Epplin EK, Rodriguez M, Al-Zubeidi DN, Wardenburg JB, Hunstad DA. 2013. A serologic correlate of protective immunity against community-onset *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases* 56(11):1554-1561. DOI: 10.1093/cid/cit123.
- Greenwood D. 1989. *Antibiotics Sensitivity Testing in Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford (GB): Oxford University Press.
- Hamburger M, Slacanin I, Hostettmann K, Dyatmiko W and Sutarjadi. 1992. Acetylated saponins with molluscicidal activity from *Sapindus rarak*: Unambiguous structure determination by proton nuclear magnetic resonance and quantitative analysis. *Phytochemical Analysis* 3(5):231-237.
- Harborne BJ. 2008. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. New Delhi (IND): Springer India.
- Huang H, Xiao X, Ghadouani A, Wu J, Nie Z, Peng C, Xu X, Shi J. 2015. Effects of natural flavonoids on photosynthetic activity and cell integrity in *Microcystis aeruginosa*. *Toxins* 7(1):66-80. DOI: 10.3390/toxins7010066.
- Hutapea JR. 1993. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia II*. Jakarta (ID): Departemen Kesehatan RI.
- Kaneko T, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K, Minh Duc N. 1998. n-Alkyl glycosides and p-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia cujete*. *Phytochemistry* 47(2):259-263. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00409-3.
- Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8:423-435. DOI: 10.1038/nrmicro2333.
- Kubo I, Muroi H, Himejima M. 1992. Antimicrobial activity of green tea flavor component and their combination effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(2):245-248. DOI: 10.1021/jf00014a015.
- Kusuma AM, Sulistyono AN, Susanti S, Sabikis S. 2014. Aktivitas penghentian pendarahan luar ekstrak etanol daun berenuk (*Crescentia cujete* L.) secara *in-vivo*. *Pharmaceutical Sciences and Research* 1(2):134-139. DOI: 10.7454/psr.v1i2.3299.
- Kusumaningtyas E, Widiati RR, Gholib D. 2008. Uji daya hambat ekstrak dan krim ekstrak daun sirih (*Piper betle*) terhadap *Candida albicans* dan *Trichophyton mentagrophytes*. Dalam: Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Inovasi Teknologi Mendukung Pengembangan Agribisnis Peternakan Ramah Lingkungan, Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Balitbang Pertanian, Bogor 11-12 November 2008.

- Lee TH, Jung M, Bang MH, Chung DK, Kim J. 2012. Inhibitory effects of a spinasterol glycoside on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via down-regulating MAP kinase pathways and NF- κ B activation in RAW264.7 macrophage cells. *International Immunopharmacology* 13(3):264-270. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.05.005.
- Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N, Mody RK. 2014. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiology and Infection* 142(11):2270-2280. DOI: 10.1017/S0950268813003233.
- Mahbub KR, Hoq MM, Ahmed MM, Sarker A. 2011. In vitro antibacterial activity of *Crescentia cujete* and *Moringa oleifera*. *Bangladesh Research Publications Journal* 5(4):337-343.
- Natta L, Orapin K, Krittika N, Pantip B. 2008. Essential oil from five Zingiberaceae for anti-foodborne bacteria. *International Food Research Journal* 15(3):337-346.
- Nurhasanah, Harlia, Adhtiyawarman. 2014. Uji bioaktivitas ekstrak daun maja (*Crescentia cujete* Linn.) sebagai antirayap. *Jurnal Kimia Khatulistiwa* 3(3):43-48.
- Ogbuagu MN. 2008. The nutritive and anti-nutritive compositions of Calabash (*Crescentia cujete*) fruit pulp. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 7(9):1069-1072.
- Otto M. 2014. *Staphylococcus aureus* toxins. *Current Opinion in Microbiology* 17:32-37. DOI: 10.1016/j.mib.2013.11.004.
- Pareira SG, de Araujo SA, Guilhon GMSP, Santos LS, Junior LMC. 2017. In vitro acaricidal activity of *Crescentia cujete* L. fruit pulp against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitology Research* 116(5):1487-1493. DOI: 10.1007/s00436-017-5425-y
- Parvin MS, Das N, Jahan N, Akhter MA, Nahar L, Islam ME. 2015. Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Research Notes* 8:412-418. DOI: 10.1186/s13104-015-1384-5.
- Pasicolan VLL, Juan MECS, Cachero EE, de Panay CA, Gestupa LGN, Sarona GJN, Tahad JD. 2014. Flavonoid screening and antiplatelet aggregation activity of miracle fruit. *Root Gatherers* 7(2014):74-89.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 2007. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Volume ke-1. Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL, penerjemah. Jakarta (ID): UI Press. Terjemahan dari: *Elements of Microbiology*.
- Ramos MPO, Silva GDF, Duarte LP, Peres V, Miranda RRS, de Souza GHB, Belinelo VJ, Filho SAV. 2010. Antinociceptive and edematogenic activity and chemical constituents of *Talinum paniculatum* Willd. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2(6):265-274.
- Rinawati ND. 2011. Daya antibakteri tumbuhan majapahit (*Crescentia cujete* L.) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* [skripsi]. Surabaya (ID): Institut Teknologi Sepuluh November.
- Safirah R, Widodo N, Budiyanto MAK. 2016. Uji efektifitas insektisida nabati buah *Crescentia cujete* dan bunga *Syzygium aromaticum* terhadap mortalitas *Spodoptera litura* secara *in vitro* sebagai sumber belajarbiologi. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia* 2(3):265-276. DOI: 10.22219/jpbi.v2i3.3874.
- Safithri M, Kurniawati A and Syaefudin. 2016. Formula of *Piper crocatum*, *Cinnamomum burmanii*, and *Zingiber officinale* extracts as a functional beverage for diabetics. *International Food Research Journal* 23(3):1123-1130.
- Sani RN, Nisa FC, Andriani RD, Maligan JM. 2014. Analisis rendemen dan skrining fitokimia ekstrak etanol mikroalga laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 2(2):121-126.

- Sembiring BB, Suhirman S. 2014. Pengaruh Cara Pengeringan dan Teknik Ekstraksi Terhadap Kualitas Simplisia dan Ekstrak Meniran. *Prosiding Seminar Nasional Pengembangan Teknologi Pertanian Politeknik Negeri Lampung*, Lampung 24 Mei 2014.
- Setiafianti EM, Kusuma SAF, Ramdhani D. 2017. Effect of drying time and temperature on water content of klutuk banana (*Musa balbisiana* Colla) flour. *International Journal of Scientific Engineering and Applied Science* 3(7):87-93.
- Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 2:a000414. DOI: 10.1101/cshperspect.a000414
- Savolainen H. 1992. Tannin content of tea and coffee. *Journal of Applied Toxicology* 12(3):191-192. DOI: 10.1002/jat.2550120307.
- Sulistiyani, Falah S, Wahyuni WT, Sugahara T, Tachibana S, Syaefudin. 2014. Cellular mechanism of the cytotoxic effect of extracts from *Syzygium polyanthum* leaves. *American Journal of Drug Discovery and Development* 4(2):90-101. DOI: 10.3923/ajdd.2014.90.101
- Sutjipto S, Wahyu JP, Widiastuti Y. 2009. Pengaruh cara pengeringan terhadap perubahan fisikokimia daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus* Benth). *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia* 2(1):24-27.
- Syaefudin, Safithri M and Hasanah U. 2016. Stabilitas total fenolik, aktivitas antioksidan, dan aktivitas penghambatan α -glukosidase pada minuman fungsional berbasis sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.). *Jurnal Gizi dan Pangan* 11(2):83-90.
- Syaefudin, Wahyuni WT, Artika IM, Sulistiyani. 2014. Antioxidant activity of flavonoid from *Guazuma ulmifolia* Lamk. leaves and apoptosis induction in yeast cells. *Journal of Biological Sciences* 14(4):305-310. DOI: 10.3923/jbs.2014.305.310
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. 2007. *Microbiology*. Ed Ke-9. San Fransisco (US): Pearson Education.
- Trevisan G, Rossato MF, Walker CI, Klafke JZ, Rosa F, Oliveira SM, Tonello R, Guerra GP, Boligon AA, Zanon RB, Athayde ML, Ferreira J. 2012. Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 343(2012):258-269. DOI: 10.1124/jpet.112.195909.
- Ulett GC, Totsika M, Schaale K, Carey AJ, Sweet MJ, Schembri MA. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current Opinion in Microbiology* 16(1):100-107. DOI: 10.1016/j.mib.2013.01.005
- Wahyuni R, Guswandi, Rivai H. 2014. Pengaruh cara pengeringan dengan oven, kering angin, dan cahaya matahari langsung terhadap mutu simplisia herba sambiloto. *Jurnal Farmasi Higea* 6(2):126-133.
- Yani A. 2004. Fraksinasi komponen aktif antibakteri ekstrak kulit batang tanaman berenuk (*Crescentia cujete* L.) [skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Zhu J, Wang M, Wen W and Yu R. 2015. Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Pharmacognosy Review* 9(17):24-28. DOI: 10.4103/0973-7847.156323.