EFEK ANTIBAKTERI EKSTRAK KULIT BUAH DELIMA (*PUNICA GRANATUM*) TERHADAP *SHIGELLA DYSENTERIAE* SECARA *IN VITRO*

ANTIBACTERIAL EFFECT OF POMEGRANATE'S (*PUNICA GRANATUM*) RIND EXTRACT AGAINST *SHIGELLA DYSENTERIAE* *IN VITRO*

Teguh Prihantoro*, Rasjad Indra **, Sumarno ***

* Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

** Laboratorium Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

*** Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

ABSTRACT

Shigella dysenteriae is the most common organisms which causes bacillary dysentery in developing countries with high mortality. Pomegranates (*Punica granatum*) have been used since a long time ago in folk medicine for several purposes. The antibacterial activity was linked to the presence of major phytochemicals like flavonoids, triterpenes, phenols, and ellagitannin. The aim of this experimental study was to evaluate the antibacterial effect of Pomegranate's (*Punica Granatum*) rind extract against *Shigella dysenteriae* and to determine the relationship between concentrations of Pomegranate's rind extract with the growth of *Shigella dysenteriae* in vitro. Antimicrobial effect was determined by tube dilution method. This consists of determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs), and Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs). The concentrations of Pomegranate's (*Punica Granatum*) rind extract were 0.8%, 1%, 1.2%, 1.4%, 1.6%, and 1.8%. At low extract concentration (0.8%) bacterial growth was delayed, while at higher extract concentration (1.8%) bacterial growth was eliminated (ANOVA, $p = 0.000$, Regression $R = -0.901$). The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) value could not be obtained, while the Minimum Bactericidal Concentrations (MBCs) value on 1.8%. The conclusion of this experimental study is that pomegranate's rind extract has antibacterial effect against *Shigella dysenteriae*.

key words: *Shigella dysenteriae*, Pomegranate's rind extract, antibacterial activity

PENDAHULUAN

Shigella merupakan penyebab utama terjadinya disentri basiler, yaitu suatu penyakit yang ditandai dengan nyeri perut hebat, diare yang sering dan sakit, dengan volume tinja sedikit disertai dengan adanya lendir dan darah (1). Kebanyakan penyakit ini terjadi pada anak umur 1-10 tahun dan menjadi suatu masalah kesehatan yang sangat penting untuk diperhatikan, karena pada penyakit ini, penderita dapat mengalami diare yang hebat hingga 20-30 kali sehari yang dapat mengakibatkan terjadinya dehidrasi, dan bila tidak segera diatasi dehidrasi tersebut akan dapat mengakibatkan terjadinya kematian (2).

Di Amerika Serikat, gejala disentri basiler lebih banyak disebabkan oleh *Shigella sonnei* dibandingkan spesies lainnya. Pada tahun 1989, terdapat 25.010 kasus shigellosis yang dilaporkan ke Center of Disease Control (CDC), 80% disebabkan oleh *Shigella sonnei*, sisanya terutama disebabkan oleh *Shigella flexneri*, sedangkan *Shigella dysenteriae* dan *Shigella boydii* menyebabkan

kurang dari 2% dari seluruh infeksi *Shigella* di Amerika Serikat (3). Hal ini berkebalikan dengan kejadian di negara-negara yang sedang berkembang yang higien dan sanitasinya jelek, *Shigella dysenteriae* dan *Shigella boydii* merupakan spesies yang lebih sering diisolasi, diikuti *Shigella flexneri* dan *Shigella sonnei* (1).

Prognosa disentri basiler menjadi lebih buruk apabila bakteri penyebabnya adalah *Shigella dysenteriae* dan terjadi pada anak-anak (1). Diperkirakan dari sekitar 140 juta kasus shigellosis pada anak dengan usia dibawah 5 tahun di dunia setiap tahunnya, sekitar 600.000 diantaranya meninggal dunia (4). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa disentri basiler merupakan masalah kesehatan yang serius dan harus diberikan penanganan yang tepat. Tindakan yang harus segera diberikan kepada penderita shigellosis adalah mencegah terjadinya dehidrasi, serta pemberian obat antibakteri sebagai terapi kausatif, akan tetapi, dengan semakin banyaknya ditemukan kasus resistensi bakteri terhadap antibiotik, pemakaian antibiotik harus tetap diwaspadai dan diperlukan suatu alternatif terapi sebagai pilihan terapi kausatif terhadap terjadinya disentri basiler ini.

Delima telah lama dimanfaatkan buahnya untuk dikonsumsi dan beberapa bagian dari tanaman Delima dimanfaatkan sebagai obat berbagai penyakit. Semua

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXII, No. 3, Desember 2006
Korespondensi: Sumarno; Laboratorium Mikrobiologi Fakultas
Kedokteran Unibraw Malang; Jl. Veteran Malang 65145; 0341
– 580993 ext 128

bagian tanaman bersifat antivirus, dan antibakteri. Sebagai antibakteri, beberapa senyawa fitokimia dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri penyebab penyakit. Salah satunya adalah kandungan *ellagitannin* dari tanaman Delima (*Punica granatum*), yang terutama terdapat pada bagian kulit buahnya (5). Selain *ellagitannin*, kulit buah Delima juga mengandung flavonoid, triterpenes, dan phenol yang terbukti memiliki efek antibakteri terhadap *Escherichia coli* (6).

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak kulit buah Delima terhadap *Shigella dysenteriae* secara *in vitro* dan mengetahui korelasi antara perbedaan konsentrasi ekstrak kulit buah Delima yang diberikan dengan jumlah koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh.

METODE

Penelitian ini menggunakan studi *true experimental in vitro* dengan menggunakan metode *tube dilution test* untuk mengetahui potensi ekstrak kulit buah Delima (*Punica granatum*) sebagai antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*. *Tube dilution test* meliputi dua tahap, yaitu penentuan KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum). Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak kulit buah Delima yang mampu menghambat pertumbuhan kuman uji (*Shigella dysenteriae*), ditandai dengan lebih jernihnya larutan pada tabung perlakuan apabila dibandingkan dengan tabung kontrol bahan.

Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak kulit buah Delima yang mampu membunuh kuman uji (*Shigella dysenteriae*), ditandai oleh penurunan jumlah koloni pada media NAP dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% original inokulum (7).

Dalam penelitian ini akan digunakan 6 konsentrasi ekstrak kulit buah Delima yang berbeda, 1 kelompok kontrol bakteri, dan 1 kelompok kontrol bahan. Untuk masing-masing perlakuan dilakukan empat kali pengulangan. Ekstrak kulit buah Delima adalah larutan hasil ekstraksi ethanol kulit buah Delima. Konsentrasi ekstrak adalah kadar kulit buah Delima yang telah mengalami ekstraksi dan pengenceran dengan menggunakan metode *tube dilution test*.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit buah Delima yang digunakan, yaitu konsentrasi 1,8%, 1,6%, 1,4%, 1,2%, 1%, dan 0,8%. Sedangkan variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat kekeruhan tabung uji dan jumlah koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada NAP (*Nutrient Agar Plate*).

Jumlah koloni adalah jumlah koloni kuman *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) setelah dilakukan inkubasi selama 18-24 jam.

Sebelum diberi perlakuan, bakteri uji terlebih dahulu diidentifikasi karakteristiknya. Meliputi pengamatan sifat koloni pada medium Mac Conkey, pewarnaan Gram, Inokulasi pada TSI (*Triple Sugar Iron*) agar, uji IMVIC (*Indol Methylred Vogesproskauer Citrat*) dan Uji kepekaan terhadap Trimetoprim-sulfametoxazole, Ampicillin, Nalidixic acid, dan Ciprofloxacin. Selanjutnya dikelompokkan menjadi 8 kelompok perlakuan yang merupakan campuran antara ekstrak kulit buah Delima (konsentrasi tertentu) dengan bakteri *Shigella dysenteriae* (kepadatan 10 bakteri/ml) (6) sebagai berikut:

1. Kontrol bahan (0% ekstrak kulit buah Delima)
2. 0,8% ekstrak kulit buah Delima
3. 1% ekstrak kulit buah Delima
4. 1,2% ekstrak kulit buah Delima
5. 1,4% ekstrak kulit buah Delima
6. 1,6% ekstrak kulit buah Delima
7. 1,8% ekstrak kulit buah Delima
8. Kontrol kuman (100% ekstrak kulit buah Delima)

Kadar Hambat Minimal dari ekstrak kulit buah Delima ditentukan dengan melakukan pengamatan kekeruhan larutan pada tabung setelah dilakukan inkubasi selama 18-24 jam. Sedangkan Kadar Bunuh Minimal ditentukan setelah dilakukan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh pada agar padat NAP, yang merupakan hasil *striking* larutan pada tiap tabung perlakuan. Data yang diperoleh dari penghitungan jumlah koloni selanjutnya dianalisa statistik dengan menggunakan program SPSS 12.

HASIL PENELITIAN

Dari identifikasi, didapatkan hasil bahwa bakteri yang digunakan memiliki ciri: koloni bakteri pada Mac Conkey berbentuk bulat, konveks, dengan tepi yang utuh dan tidak berwarna (pucat), berbentuk batang ramping, Gram negatif, tidak membentuk spora, pada TSI (alkali/asam, gas-), *Indole* (+), *Methyl red* (+), *Voges Proskauer*(-), *Citrat* (-), Motilitas (-), resisten terhadap ampicillin.

Kadar Hambat Minimal ekstrak kulit buah Delima pada penelitian ini tidak dapat ditentukan, karena larutan campuran ekstrak dan bakteri berwarna gelap dan keruh. Hasil penentuan kekeruhan larutan ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Kadar Bunuh Minimal ekstrak kulit buah Delima terhadap *Shigella dysenteriae* adalah konsentrasi 1,8%. Hasil *striking* kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 1 Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM)

Keterangan :

1. Kontrol bahan
2. 0,8% ekstrak kulit buah Delima+ 1cc bakteri *Shigella dysenteriae*
3. 1% ekstrak kulit buah Delima + 1cc bakteri *Shigella dysenteriae*
4. 1,2% ekstrak kulit buah Delima+ 1cc bakteri *Shigella dysenteriae*
5. 1,4% ekstrak kulit buah Delima+ 1cc bakteri *Shigella dysenteriae*
6. 1,6% ekstrak kulit buah Delima+ 1cc bakteri *Shigella dysenteriae*
7. 1,8% ekstrak kulit buah Delima+ 1cc bakteri *Shigella dysenteriae*
8. Kontrol kuman

Gambar 2 Koloni yang Tumbuh pada NAP

Keterangan :

1. Kontrol kuman
2. Kontrol bahan
3. Konsentrasi ekstrak 0,8%
4. Konsentrasi ekstrak 1%
5. Konsentrasi ekstrak 1,2%
6. Konsentrasi ekstrak 1,4%
7. Konsentrasi ekstrak 1,6%
8. Konsentrasi ekstrak 1,8%

Hasil penghitungan jumlah koloni yang tumbuh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Jumlah Koloni yang Tumbuh

Konsentrasi	Rata-rata $\pm$ SD
0,80%	144 $\pm$ 36,579
1,00%	74 $\pm$ 5,944
1,20%	42,5 $\pm$ 8,103
1,40%	29,75 $\pm$ 10,532
1,60%	2 $\pm$ 2,160
1,80%	0

Kurva korelasi antara konsentrasi ekstrak kulit buah delima dengan jumlah koloni yang tumbuh dapat dilihat pada Gambar 3.

Gambar 3. Kurva Estimasi Hubungan Konsentrasi Ekstrak terhadap Jumlah Koloni

Jumlah koloni pada kontrol kuman tidak dapat dihitung karena jumlahnya sangat banyak. Oleh karena itu, agar jumlah koloni pada kontrol kuman dapat dihitung, maka diencerkan hingga 1000 kali, kemudian baru dilakukan *striking* pada NAP. Hasil *striking* dari pengenceran kontrol kuman ini didapatkan jumlah rata-rata koloni sebanyak 81 dengan standar deviasi sebesar 14.49, berarti pada kontrol kuman didapatkan rata-rata koloni sebanyak 81000. Pada kelompok kontrol bahan tidak didapatkan adanya koloni bakteri yang tumbuh. Hal ini berarti bahwa larutan ekstrak kulit buah Delima yang digunakan dalam penelitian ini tidak terkontaminasi oleh bakteri apapun.

Penghitungan jumlah koloni pada *original inoculum* didapatkan jumlah koloni rata-rata adalah 236 koloni. Jadi Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak kulit buah Delima terhadap *Shigella dysenteriae* adalah konsentrasi 1.8% karena jumlah koloni pada konsentrasi tersebut $< 0.1\%$ dari *original inoculum*.

Dari analisis SPSS didapatkan hasil uji ANOVA dengan $p < 0,05$, Pada uji korelasi didapatkan nilai $R = -0,901$, dan persamaan regresi $y = 224,905 - 13553,57x$ (y adalah jumlah koloni yang tumbuh, dan x adalah besarnya konsentrasi ekstrak kulit buah delima dalam larutan campuran ekstrak kulit buah delima dan bakteri uji).

DISKUSI

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas ekstrak kulit buah Delima sebagai antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*. Metode yang digunakan adalah metode dilusi tabung yang terdiri dari dua tahap, yaitu penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan penentuan Kadar Bunuh Minimum (KBM). KHM dari ekstrak kulit buah Delima tersebut ditentukan dengan cara membandingkan kekeruhan larutan pada tabung kelompok kontrol kuman dengan kelompok yang lain. Sedangkan penentuan Kadar Bunuh Minimum dilakukan dengan cara menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada NAP (7).

Untuk mendapatkan efek maksimal dari zat aktif yang terdapat pada kulit buah Delima ini, dilakukan metode ekstraksi etanol. Metode ini berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Voravuthikunchai, dkk (2005), yang melakukan penelitian efek antibakteri beberapa metode ekstraksi kulit buah Delima terhadap *Escherichia coli*. Dari penelitiannya didapatkan hasil bahwa metode ekstraksi etanol kulit buah Delima menunjukkan efek yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* apabila dibandingkan dengan menggunakan metode ekstraksi dengan air mendidih maupun ekstraksi dengan menggunakan kloroform (8).

Pada penelitian ini, setelah dilakukan proses ekstraksi etanol dari kulit buah Delima, didapatkan hasil berupa larutan pekat yang berwarna coklat gelap. Warna larutan yang gelap mempersulit dalam mengamati kejernihan tabung-tabung yang merupakan campuran antara bakteri uji dengan larutan ekstrak kulit buah Delima. Pengamatan kejernihan larutan ini sebenarnya bermanfaat dalam menentukan Kadar Hambat Minimum dari larutan ekstrak kulit buah Delima terhadap pertumbuhan bakteri uji (*Shigella dysenteriae*). Warna coklat pada larutan ekstrak tersebut kemungkinan disebabkan karena banyaknya kandungan tannin pada kulit buah Delima. Hasil yang sama juga didapatkan pada penelitian yang dilakukan oleh Seeram, dkk (2004) untuk mendapatkan ekstrak murni tannin dari kulit buah Delima. Pada penelitiannya tersebut didapatkan hasil ekstrak berupa serbuk tannin yang berwarna coklat gelap (9).

Dengan adanya warna yang gelap pada penelitian ini menyebabkan Kadar Hambat Minimum dari ekstrak kulit buah Delima terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae*, tidak dapat ditentukan, sehingga untuk mengetahui kadar hambat minimal dari ekstrak kulit buah Delima terhadap *Shigella dysenteriae* sebaiknya digunakan metode lain, seperti difusi cakram atau metode *E test* (1).

Hasil penghitungan jumlah koloni pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 1, dari tabel tersebut dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kulit buah Delima berpengaruh terhadap penurunan jumlah bakteri. Hal ini dibuktikan dengan hasil analisa SPSS yang menunjukkan

hasil signifikan (ANOVA, $p = 0,000$). Jumlah koloni yang tumbuh semakin menurun dengan meningkatnya konsentrasi yang diberikan (Regresi, $R = -0,901$), dan efek dari ekstrak kulit buah Delima ini maksimal pada konsentrasi 1,8%, yang semua bakteri mengalami kematian pada konsentrasi ini. Pengaruh ekstrak kulit buah Delima terhadap kematian bakteri tersebut disebabkan karena pada larutan ekstrak kulit buah Delima terdapat beberapa zat aktif yang dapat berfungsi sebagai antibakteri, diantaranya adalah *flavonoid*, *triterpenes*, *phenol* dan *tannin* (8).

Flavonoid merupakan suatu bahan yang mempunyai struktur fenol dengan satu *carbonil group* (10). Senyawa ini telah diketahui disintesis oleh tanaman dalam responnya terhadap infeksi mikroba (11). Aktivitas *flavonoid* kemungkinan disebabkan oleh kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler maupun yang terlarut, serta dapat membentuk kompleks dengan dinding sel. Semakin lipofilik suatu *flavonoid*, kemampuannya dalam merusak dinding sel dari bakteri akan semakin kuat (11). *Catechin* merupakan golongan *flavonoid* yang telah banyak dibuktikan manfaatnya oleh beberapa peneliti dalam peranannya sebagai bahan antibakteri. Pada penelitian yang dilakukan oleh Borris (1996) didapatkan hasil bahwa *catechins* dari teh hijau dapat menginaktivasi *cholera toxin* dari *Vibrio cholera* (12). Dan pada penelitian Nakahara, dkk (1993) juga dibuktikan bahwa *catechin* dari teh oolong terbukti dapat menghambat enzim *glucosyltransferase* dari bakteri *Staphylococcus mutans* yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian pada bakteri tersebut (13). Pada kulit buah Delima terdapat *flavonoid* dari golongan *gallo catechin* yang kemungkinan juga berperan sebagai penyebab kematian bakteri *Shigella dysenteriae* pada penelitian ini (12).

Triterpenes merupakan senyawa yang dapat memberikan bau atau aroma khas pada tanaman (11). Walaupun mekanisme kerja *triterpenes* sebagai bahan antibakteri belum diketahui dengan baik, akan tetapi diduga terlibat dalam kerusakan membran sel oleh senyawa lipofilik (10).

Bahan aktif lainnya yang berperan sebagai penyebab kematian bakteri dalam penelitian ini adalah dari golongan senyawa fenol. Mekanisme yang dianggap bertanggung jawab terhadap toksisitas fenol pada mikroorganisme meliputi inhibitor enzim oleh senyawa yang teroksidasi, kemungkinan melalui reaksi dengan gugus sulfhidril atau melalui interaksi non-spesifik dengan protein (7). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Retno Sudewi (1992) menunjukkan bahwa kandungan fenol dalam daun salam secara *in vitro* terbukti dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (14).

Bahan antibakteri terbanyak yang terdapat pada kulit buah Delima adalah golongan tannin, terutama kelompok

ellagitannin (sekitar 26%) (15). Senyawa ini mampu menghambat enzim *DNA-topoisomerase*, dengan dihambatnya aktifitas enzim ini, akan mengakibatkan terhambatnya proses replikasi bakteri tersebut (8). Keberadaan dari beberapa bahan yang memiliki sifat antibakteri tersebut memberikan efek sinergis terhadap menurunnya jumlah *Shigella dysenteriae* dalam penelitian ini. *Ellagitannin* memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan dan replikasi, sedangkan senyawa antibakteri yang lainnya memiliki kemampuan untuk merusak dinding sel dari bakteri. Dengan rusaknya dinding sel dari bakteri ini akan mengakibatkan keluarnya substansi seluler dari bakteri tersebut dan akan menyebabkan kematian pada bakteri.

KESIMPULAN

1. Secara *in vitro*, ekstrak kulit buah Delima memiliki efek antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*. Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak kulit buah Delima tidak dapat ditentukan, sedangkan Kadar Bunuh Minimum (KBM) sebesar 1,8%.
2. Terdapat korelasi antara perbedaan konsentrasi ekstrak kulit buah Delima yang diberikan dengan

jumlah bakteri yang masih bisa bertahan hidup. Semakin tinggi konsentrasi, semakin sedikit bakteri yang masih bisa hidup.

SARAN

1. Dilakukan penelitian dengan metode yang berbeda, sehingga KHM dari ekstrak kulit buah Delima terhadap *Shigella dysenteriae* dapat ditentukan.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap efek antibakteri dari ekstrak kulit buah Delima terhadap *Shigella dysenteriae* secara *in vivo*, sehingga nantinya bahan aktif dari kulit buah Delima ini dapat dijadikan alternatif terapi terhadap kasus shigellosis pada manusia.
3. Dilakukan penelitian lanjutan tentang toksisitas bahan aktif dari kulit buah Delima terhadap manusia, sehingga dapat diketahui apakah bahan aktif dari kulit buah Delima aman bagi manusia atau tidak.
4. Dilakukan penelitian serupa untuk menguji efek antibakteri dari ekstrak kulit buah Delima terhadap bakteri penyebab infeksi lainnya.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Dzen SJ, Roekistiningsih, Santoso S, Winarsih S. *Bakteriologi Medik*. 1st Ed. Malang: Bayumedia Publishing; 2003
2. Hembing. *Jangan Anggap Remeh Disentri*. Online [www]. 2006 (<http://www.rsud.kebumen.go.id/modules.php?op=modload&name=News&file=article&sid=63>, diakses tanggal 29 april 2006)
3. Supardi I dan Sukanto. *Mikrobiologi Dalam Pengolahan Dan Keamanan Pangan*. Bandung: Penerbit Alumni; 1999.
4. Gerald. *Diseases Caused By Gram-Negative Enteric Bacilli in Harrison Principal of Internal Medicine 15th Edition*. USA: McGraw Hill Company Inc; 1996
5. Henriette's Herbal. *Granatum (U.S.P) – Pomegranate*. Online [www]. 2000 (<http://www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/kings/punica.html>, diakses tanggal 12 April 2006)
6. Supayang Voravuthikunchai, Treechada Shirirak, Surasak Limsuwan, Thanomjit Supawita, Tetsuya Iida, Takehi Honda. *Inhibitory Effects Of Active Compounds From Punica Granatum Pericarp On Verotoxin Production By Enterohemorrhagic Escherichia*. 2005. Coli157:H7. (online) ([http://jhs.pharm.or.jp/51\(5\)/51_590.pdf](http://jhs.pharm.or.jp/51(5)/51_590.pdf), diakses tanggal 12 April 2006).
7. Pioneerherbs. *Punica Granatum*. 2000. (online)(http://www.pioneerherbs.com/punica_granatum.htm, diakses tanggal 12 April 2006)
8. Jawetz E, JL Melnick, EA Aldelberg, G Bonang. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Edisi 16. Jakarta : EGC; 1996.
9. Coli157:H7.(online)([http://jhs.pharm.or.jp/51\(5\)/51_590.pdf#search=%22inhibitory%20effect%20of%20active%20compounds%20from%20punica%20granatum%20filetype%3Apdf%20](http://jhs.pharm.or.jp/51(5)/51_590.pdf#search=%22inhibitory%20effect%20of%20active%20compounds%20from%20punica%20granatum%20filetype%3Apdf%20), diakses tanggal 20 April 2006)
10. Marjorie Murphy Cowan. *Plant Products as Antimicrobial Agent*. (online)(<http://www.asmus.org>, diakses tanggal 6 Agustus 2006)
11. Yolanda LatraViata Aginza. *Senyawa Antibakteri dari Tanaman*. (online) (<http://ginanjar.tv/web/content.php?article.66>, diakses tanggal Mei 2005)
12. Sydney M Finegold, Ellen Jo Baron. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 7th Edition*. Missouri: The Cv Mosby Company; 1986
13. N. Seeram, R Lee, M Hardy, D Heber. *Rapid Large Scale Purification Of Ellagitannins From Pomegranate Husk, A By-Product Of The Commercial Juice Industry*. (online) (www.sciencedirect.com, diakses tanggal 19 juli 2006)
14. Borris Rp. *Natural Products Research: Perspectives from A Major Pharmaceutical Company*. (online) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/wuery.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Abstract&list_uids=9213624, diakses tanggal 6 Agustus 2006).

15. Nakahara K, S Kawabata, H Ono, K Ogura, T Tanaka, T Ooshima, and S Hamada. *Inhibitory Effect Of Oolong Tea Polyphenols On Glucosyltransferases Of Mutans Streptococci*. Online [www]. 1993 (<http://cmr.highwire.org/cgi/ijlink?linkType=ABST&journalCode=aem&resid=59/4/968>, diakses tanggal 29 maret 2006)
16. Anonymous. *Renaissance Herbs*. (online) (<http://www.renaissanceherbs.com/products/Pomegranate40PIS.pdf#search=%22pomegranate%2040%20%20%22ellagic%20acid%20%22%20filetype%3Apdf%22>, diakses tanggal 29 april 2006).
17. Sudewi, Retno. *Isolasi dan Uji Daya Antibakteri Minyak Atsiri Daun Salam (Eugeniapolyntha wight)*. Yogyakarta: FF UGM; 1992.
18. Levinson WE, Jewetz. *Medical Microbiology and Immunology Sixth Edition*. Singapore: Mc Graw-Hill company Inc; 2000.