

Aktivitas antibakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae* ekstrak teh putih dalam variasi jenis pelarut

Antibacteriral activities of Bacillus cereus and Shigella dysenteriae of white tea extract in several variation of solvents

Asri Widyasanti¹, Andita Mega Priantiwi², dan Dadan Rohdiana³

^{1,2} Departemen Teknik dan Manajemen Industri Pertanian,
Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran
Jl. Bandung Sumedang km 21, Jatinangor, Sumedang, 40600

³ Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung
Desa Mekarsari Kecamatan Pasirjambu Kabupaten Bandung 40972

E-mail: asriwidyasanti@gmail.com

Diajukan: 01 Maret 2016; direvisi: 01 Maret 2016; diterima: 16 Mei 2016

Abstrak

Teh digunakan dalam industri pangan, kosmetik, dan obat herbal. Teh putih merupakan jenis teh yang mengandung polifenol cukup tinggi dibandingkan jenis teh lainnya. Sehingga berpotensi sebagai antibakteri alami. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak teh putih dalam variasi pelarut konsentrasi 13% (b/v) terhadap aktivitas bakteri gram positif (*Bacillus cereus*) dan bakteri gram negatif (*Shigella dysenteriae*). Metode eksperimental laboratorium digunakan dalam penelitian deskriptif ini. Perlakuan yang dilakukan dalam pengujian aktivitas antibakteri meliputi penentuan diameter daya hambat dan total pertumbuhan bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak teh putih terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri, oleh karena itu, ekstrak teh putih dari pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 96% dapat dikembangkan sebagai antibakteri. Diameter daerah penghambatan terhadap bakteri *Bacillus cereus* ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol 96% pada konsentrasi 13% (b/v) berturut-turut adalah 0,6 mm, 10,5 mm, dan 12,75 mm, sedangkan untuk bakteri *Shigella dysenteriae* berturut-turut adalah 0,5

mm, 9,86 mm, dan 10,6 mm. Total pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol 13% (b/v) berturut-turut adalah $1,3 \times 10^7$, $6,0 \times 10^6$, dan $1,1 \times 10^4$ CFU/ml, dan untuk bakteri *Shigella dysenteriae* berturut-turut adalah $1,0 \times 10^7$, $6,5 \times 10^6$, dan $4,6 \times 10^6$ CFU/ml.

Kata kunci: Antibakteri, *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, ekstrak teh putih

Abstract

Tea is used in the food, cosmetic, and herbal drug industries. White tea is a kind of tea containing a relatively high polyphenol content compared to other kind of tea, and thus has the potential of being used as a natural antibacterial. The objective of this research was to study the antibacterial activity of white tea extract in several variation of 13% (w/v) concentration of solvents to the activity of gram-positive bacteria (*Bacillus cereus*) and gram-negative bacteria (*Shigella dysenteriae*). Laboratory experimental method was used in this descriptive study. The antibacterial activity

study was comprised of estimating inhibition area and total of bacterial growth. The results revealed that white tea extract inhibited bacterial growth, indicating that white tea extract from the n-hexane, ethyl acetate and 96% ethanol solvents could be developed as an antibacterial material. The diameter of the inhibition area to *Bacillus cereus* bacteria for n-hexane, ethyl acetate, and ethanol 13% (w/v) solvents were 0.6 mm, 10.5 mm and 1.75 mm, respectively; while for *Shigella dysenteriae* bacteria were 0,5 mm, 9,86 mm and 10,6 mm, respectively. The total growth of *Bacillus cereus* bacteria for n-hexane, ethyl acetate, and ethanol 13% (w/v) solvent were 1.3×10^7 , 6.0×10^6 , and 1.1×10^4 CFU / ml, and of *Shigella dysenteriae* bacteria were 1.0×10^7 , 6.5×10^6 and 4.6×10^6 CFU / ml, respectively.

Keywords: Antibacteria, *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, white tea extract

PENDAHULUAN

Di Indonesia, tanaman teh merupakan salah satu komoditas perkebunan yang cukup banyak diusahakan dan dijadikan tanaman industri. Menurut Badan Pusat Statistik (2013) 67,9% jumlah produksi teh di Indonesia berasal dari Jawa Barat.

Pemanfaatan teh banyak digunakan dalam industri pangan, kosmetik, dan obat herbal yang terbuat dari pucuk tanaman teh (*Camellia sinensis*) melalui proses pengolahan tertentu. Pucuk teh segar diolah dengan beberapa proses pengolahan tertentu. Untuk menghasilkan beberapa jenis teh, yaitu teh hitam, teh oolong, teh hijau, dan teh putih (BALITTRI, 2012).

Teh putih merupakan jenis teh terbaik yang diproduksi dan dihasilkan dalam jumlah yang sangat sedikit dengan harga yang jauh lebih mahal (1,5 - 2 juta rupiah per kilogram) dibandingkan dengan

jenis teh lainnya (Rayati dan Widayat, 2009).

Menurut data Asosiasi Teh Indonesia (2013), konsumsi teh putih di Indonesia sendiri masih sangat rendah, karena sekitar 80% produksi teh putih diekspor ke beberapa negara di luar negeri, seperti Inggris, Jerman, Belanda, Jepang, Australia, Rusia, hingga negara-negara Timur Tengah. Teh putih dipetik dari pucuk teh pilihan yang belum benar-benar mekar dan proses pembuatannya cukup minim, kandungan alaminya masih terjaga (Noorhamdani, *et al.*, 2013).

Teh putih diduga memiliki kandungan katekin dari golongan polifenol paling tinggi yang dapat membentuk antioksidan dalam teh yang sangat tinggi, selain membentuk antioksidan teh putih dapat dijadikan antibakteri (Haryoto, 2003). Menurut Rohdiana (2014), bahan baku teh putih yang berupa peko diduga memiliki kandungan polifenol yang paling tinggi, daun teh semakin muda kandungan polifenolnya semakin tinggi. Teh putih mengandung senyawa utama berupa tannin, *galic acid*, dan katekin. Selain katekin, kandungan tanin pada teh mempunyai sifat bakterostatik yang telah diteliti mampu menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* (Noorhamdani, *et al.*, 2013). Menurut Lay (1994), antibakteri merupakan sifat dari suatu bahan yang dibuat untuk menghambat pertumbuhan pada suhu rendah, disebut juga bakterostatik.

Pembuatan antibakteri teh putih dengan ekstraksi menggunakan variasi pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksana secara maserasi bertingkat, keuntungan cara ekstraksi ini adalah cara pengerjaan dan peralatannya sederhana serta mudah diusahakan (Ahmad, 2006). Proses

ekstraksi dilakukan secara bertingkat dimulai dengan pelarut nonpolar, pelarut semipolar dan polar sehingga diperoleh ekstrak yang mengandung berturut-turut senyawa nonpolar, semipolar dan polar (Asmaliyah *et al.*, 2011).

Menurut Haryoto (2003), ekstrak teh telah lama digunakan sebagai terapi bagi penyakit kolera, diare, dan influenza yang berkaitan dengan sifat antibakteri dari katekin. Di Indonesia, penyakit diare diperkirakan merupakan penyebab kematian utama sebanyak 2,2 juta anak. Penyakit ini timbul terutama disebabkan patogen yang berasal dari pangan dan air (*waterborne*) karena sanitasi dan kebersihan yang kurang memadai. Faktor penyebab terjadinya penyakit gangguan saluran cerna antara lain adalah infeksi mikrobial patogen. Selain *E.coli*, *B. cereus*, dan *Shigella sp* merupakan bakteri yang paling sering menyebabkan penyakit gangguan saluran cerna seperti diare. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak teh putih dalam variasi pelarut konsentrasi 13% (b/v) terhadap aktivitas bakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae*.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah teh putih yang berasal dari Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung, Bandung. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, n-heksana, etil asetat, etanol 95%, etanol 70%, asam galat, NaCl 0,85% (b/v), BaCl₂ 1% (b/v), H₂SO₄ 1% (b/v), Na₂CO₃ 5%, reagen folin ciocalteau, supernatan dan NaOH. Uji antibakteri menggunakan biakan murni bakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella*

dysenteriae yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran, akuades steril, spiritus, *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), dan *mueller hinton agar* (MHA).

Alat-alat yang digunakan adalah cawan aluminium, oven, desikator, timbangan digital (ketelitian 0,01 g), timbangan analitik (ketelitian 0,0001 g), labu ukur, tanur, *beaker glass*, *erlenmeyer flask* 1 liter, kertas saring, *rotary vacuum evaporator*, *tyler sieves* 18 mesh, corong *bunchner*, grinder yongma, pipet mikro 1000 µl, gelas ukur 100 ml, magnetic stirrer, piknometer 5 ml, aluminium foil, tissue, kapas, tabung reaksi, cawan petri, inkubator, autoklaf, rak tabung, bunsen, *colony counter*, *spektrofotometer*, *vortex*, *cuvet*, *tehrmo-hygrometer digital*, botol kaca, cawan porselin.

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium dengan analisis deskriptif, sehingga diharapkan dapat memberikan informasi tentang pembuatan antibakteri yang efektif dari teh putih terhadap aktivitas bakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae*. Uji aktivitas antibakteri secara duplo dengan konsentrasi 13% (b/v) dilakukan untuk mendapat ekstrak dengan pelarut terbaik dilihat dari nilai daya hambat yang terbesar dan total pertumbuhan bakteri.

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu :

1. Persiapan bahan baku

Tahapan persiapan bahan baku terdiri dari proses penggilingan teh putih dengan grinder, pengayakan bubuk hasil penggilingan dengan 18 mesh dan analisis mutu teh putih yang terdiri dari : pengukuran kadar air peko segar, teh putih dan bubuk peh putih (AOAC, 2005), kadar serat teh

putih, kadar ekstrak dalam air, kadar abu total (RSNI, 2014) serta perhitungan rendemen parsial penggilingan dan rendemen pengayakan.

2. Ekstraksi teh putih.

Ekstraksi teh putih dilakukan dengan metode maserasi bertingkat 1:9 (b/v) selama 24 jam, menggunakan pelarut n-heksana (non polar), etil asetat (semi polar) dan etanol 96% (polar). Masing-masing filtrat dengan polaritas berbeda diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* suhu 40°C (± 2 jam). Selanjutnya dilakukan analisis mutu ekstrak dengan pengukur rendemen parsial ekstraksi dan rendemen total, pengukuran bobot jenis maserat dan ekstrak dengan piknometer, pengujian warna ekstrak dengan *chromameter*, pengukuran kadar sisa pelarut ekstrak etanol dan pengukuran kadar total polifenol masing-masing ekstrak.

3. Pengujian aktivitas antibakteri diameter daya hambat (Cappucino dan Sherman, 2001).

Pengujian diameter daya hambat bakteri dengan metode cakram kertas, terdiri dari sterilisasi peralatan dengan oven pada suhu 180°C (120 menit); pembuatan media *nutrient agar* (NA) miring, *mueller hiton agar* (MHA) dan NaCl fisiologi 0,85 % yang disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C (15 menit); inokulasi kultur murni bakteri pada media NA, kemudian diinkubasi selama pada suhu 37°C (48 jam), larutan NaCl 0,85% dituangkan ke dalam kultur murni bakteri lalu dihomogenkan. Pembuatan larutan Mc Farland 1 untuk membandingkan kekeruhan bakteri, pembuatan media ini dengan mencampur 0,1 ml larutan BaCl₂ 1% (b/v) dan 9,9 ml larutan H₂SO₄ 1% (v/v); pengukuran absorben

kultur murni kedua bakteri dengan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 600 nm. Peremajaan bakteri pada media MHA dengan menuangkan media MHA yang telah dicairkan pada cawan petri hingga memadat, kemudian swab dicelupkan ke dalam suspensi bakteri yang telah diukur absorbansinya ditorehkan pada permukaan MHA secara zig-zag, cakram kertas diameter 5,5 mm direndam pada masing-masing ekstrak pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol 96% dengan konsentrasi 13%, pelrut etanol sebagai kontrol negatif serta masing-masing ekstrak 100% (± 7 menit). Selanjutnya cakram diletakkan di atas permukaan MHA dengan menggunakan pinset, inkubasi dengan suhu 37°C (24 jam), diameter daerah bening yang terbentuk diukur dengan pengaris, kemudian dikurangi dengan diameter cakram kertas (5,5 mm).

4. Pengukuran total pertumbuhan bakteri (TPC).

Pengujian total pertumbuhan bakteri terdiri dari sterilisasi peralatan dengan oven suhu 180°C (120 menit); pembuatan media media *nutrient agar* (NA) miring, *nutrient broth* (NB), dan NaCl fisiologis 0,85% disterilkan dalam autoklaf suhu 121°C (15 menit). Pembuatan suspensi dengan cara kultur murni masing-masing bakteri sebanyak 1 ose ditanam dalam 10 ml media cair *nutrient broth* (NB) lalu dihomogenkan, kemudian masing-masing bakteri diinkubasi pada suhu 37°C (24 jam).

Pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml ekstrak teh putih masing-masing ekstrak dengan berbagai pelarut dan suspensi bakteri dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi berisi 8 ml media NB didiamkan pada suhu ruangan

(60 menit). NaCl fisiologis 0,85% dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 9 ml, suspensi media NB sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisikan 9 ml NaCl fisiologis 0,85% (pengenceran 10^{-1}).

Suspensi pada pengenceran 10^{-1} sebanyak 1 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang lain berisikan 9 ml NaCl fisiologis 0,85%, dilakukan hingga pengenceran 10^{-5} , diambil 1 ml pada pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian ditambahkan 15-20 ml NA, cawan digoyang-goyangkan dengan gerakan memutar agar bakteri dan NA tercampur secara homogen, dibiarkan hingga me-

mat, lalu diinkubasi (24 jam) pada suhu 37°C , kemudian dilakukan perhitungan dengan *colony counter*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik teh putih

Data dari beberapa karakteristik teh putih meliputi kadar air pucuk segar, kadar air peko teh putih, kadar air bubuk teh putih, kadar serat kasar, kadar ekstrak dalam air dan kadar abu total disajikan pada Tabel 1.

TABEL 1
Nilai karakteristik teh putih

No.	Parameter	Nilai pengujian (\pm SD)	Nilai berdasarkan RSNI teh putih
1	Kadar air Pucuk segar (% bb)	$74,03 \pm 0,28$ %	-
2	Kadar air Peko teh putih (%bb)	$6,90 \pm 0,12$ %	Maksimum 8%
3	Kadar air Bubuk teh putih (%bb)	$7,05 \pm 0,12$ %	Maksimum 8%
4	Kadar serat kasar (%)	$15,53 \pm 0,35$ %	Maksimum 12,5%
5	Kadar ekstrak dalam air(%)	$42,34 \pm 14,73$ %	Minimal 32 %
6	Kadar abu total (%)	$6,84 \pm 0,37$ %	4 - 8

Nilai rata-rata dari kadar air pucuk segar yang dihasilkan adalah sekitar 74,03%, sedangkan kadar air peko teh putih sekitar 6,90%, sesuai dengan syarat mutu teh putih RSNI (Rancangan Standar Nasional Indonesia) 2014, dan kadar air peko teh putih maksimal 8%.

Pada proses pengolahan teh putih, kadar air pucuk segar berkurang karena adanya proses pelayuan dan proses pengeringan. Nilai rata-rata kadar air bubuk teh putih sekitar 7,05%, peningkatan kadar air pada bubuk karena adanya tekanan parsial uap air dari luar.

Pengujian serat kasar diukur secara gravimetri, hasil pengujian kadar serat kasar teh putih sekitar 15,53%; tidak sesuai dengan syarat mutu teh putih RSNI 2014, yaitu maksimal 12,5%. Hasil kadar serat yang cukup besar diduga dipengaruhi beberapa faktor, yaitu cara pemetikan pucuk, waktu pemetikan (semakin tua umur pucuk dan semakin tinggi kadar seratnya), dan bagian pucuk yang dipanen (Ayhan *et al.*, 2014).

Kadar ekstrak dalam air teh putih sekitar 40%, sesuai dengan syarat mutu teh putih dalam RSNI 2014, ekstrak dalam air teh putih minimal 32%. Sesuai dengan prin-

sip pengujiannya, ekstrak dalam air teh putih yang dimaksud berupa seduhan teh putih. Nilai ekstrak dalam air teh putih yang cukup besar dapat diartikan teh putih dapat melewati beberapa kali penyeduhan.

Winarno (1997) mengatakan, bahwa kadar abu dari suatu bahan pangan menunjukkan total mineral yang terkandung di dalamnya untuk mengevaluasi nilai gizi suatu bahan/ produk pangan. Kadar abu total teh putih 6,18%, sesuai dengan syarat mutu teh putih dalam RSNI 2014, menunjukkan abu total teh putih sekitar 4–8%. Pengukuran kadar abu total bertujuan untuk melihat kandungan mineral keseluruhan bukan jenis mineral tertentu, sehingga tidak dapat diketahui mineral apa saja yang terkandung dalam teh putih.

Karakteristik ekstrak teh putih Rendemen parsial dan rendemen total

Rendemen parsial merupakan rendemen dari tahap proses penggilingan, pengayakan dan proses ekstraksi. Nilai rendemen penggilingan, rendemen pengayakan dan rendemen ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 2.

TABEL 2
Rendemen parsial

Rendemen	Ulangan			Rata-rata ± SD (%)
	1	2	3	
Penggilingan	99,51	99,75	99,91	99,71±0,20
Pengayakan	99,62	99,16	99,95	99,58±0,40
Ekstraksi dengan n-heksana	0,67	0,61	0,59	0,62 ± 0,04
Ekstraksi dengan etil asetat	1,93	1,51	2,04	1,83± 0,28
Ekstraksi dengan etanol 96 %	9,54	7,50	11,26	9,43 ± 1,88

Nilai rata-rata rendemen bubuk hasil penggilingan sebesar 99,71% diperoleh dari perbandingan bobot bubuk setelah proses penggilingan dengan bobot bahan awal teh putih. Nilai rata-rata rendemen pengayakan 99,58% didapatkan dari perbandingan bobot bubuk yang lolos ayakan 18 mesh dengan bobot bubuk awal teh putih. Bubuk yang tercecer/ tertinggal pada proses penggilingan dan proses pengayakan berpengaruh terhadap nilai rendemen bubuk yang diperoleh.

Rendemen ekstraksi dari proses maserasi bertingkat dengan pelarut n-

heksana, etil asetat dan etanol secara berturut-turut adalah 0,62%; 1,83%; 9,43%, yang dihasilkan dari perbandingan bobot ekstrak setelah proses evaporasi dikurangi dengan bobot ekstrak setelah evaporasi dikalikan kadar sisa pelarut (ekstrak n-heksana dan etil asetat diasumsikan kadar sisa pelarutnya 0%) terhadap bobot bahan awal yang digunakan untuk ekstraksi berupa bubuk teh putih.

Rendemen total adalah rendemen ekstrak masing-masing pelarut. Berikut ini nilai rendemen masing-masing ekstrak teh putih pada Tabel 3.

TABEL 3
Rendemen total

Keterangan	Ulangan			Rata-rata ± SD
	1	2	3	
Rendemen ekstrak n-heksana (%)	0,66	0,60	0,58	0,61 ± 0,04
Rendemen ekstrak etil asetat (%)	1,92	1,47	2,01	1,80 ± 0,29
Rendemen ekstrak etanol (%)	9,50	7,35	11,14	9,33 ± 1,90

TABEL 4
Bobot jenis maserat

No.	Keterangan	Rata-rata ± SD
1.	Bobot Jenis maserat n-heksana	0,6165 ± 0,0012
2.	Bobot jenis maserat etil asetat	0,8634 ± 0,0033
3.	Bobot jenis maserat etanol 96 %	0,7804 ± 0,0291

TABEL 5
Bobot jenis ekstrak teh

No.	Keterangan	
1.	Bobot jenis ekstrak n-heksana	0,7694
2.	Bobot jenis ekstrak etil asetat	1,1268
3.	Bobot jenis ekstrak etanol 96 %	1,2100

Nilai rendemen total ekstrak n-heksana, etil asetat dan etanol 96% yang dihasilkan secara berturut-turut adalah 0,61%, 1,80% dan 9,33%. Ekstrak etanol bersifat polar menghasilkan rendemen paling besar, diduga bahwa zat aktif yang terkandung di dalam teh putih sebagian besar bersifat polar, dan sisanya berupa semipolar dan nonpolar.

Bobot jenis maserat dan ekstrak teh putih

Pengukuran bobot jenis maserat dan ekstrak diukur menggunakan piknometer. Bobot jenis maserat dapat dilihat pada Tabel 4.

Nilai rata-rata bobot jenis maserat n-heksana adalah 0,6165; maserat etil asetat adalah 0,8634 dan maserat etanol adalah 0,7804. Nilai dari bobot jenis sesuai dengan nilai masing-masing densitas pelarut yang digunakan, yaitu n-heksan 0,655 g/ml, etil asetat 0,894 g/ml, etanol 0,789 g/ml (Watson, 2005), karena maserat berupa ekstrak yang masih bercampur dengan pelarut. Ekstrak yang dihasilkan setelah proses pemisahan pelarut (evaporasi) berupa ekstrak kental berbentuk minyak dari pelarut n-heksana, ekstrak kental kering dari pelarut etil asetat dan ekstrak kental dari pelarut etanol 96%. Hasil pengukuran bobot jenis ekstrak dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 menunjukkan nilai bobot jenis yang dihasilkan untuk ekstrak n-heksana 0,8481, ekstrak etil asetat 1,2420, dan ekstrak etanol 1,3344. Bobot jenis ekstrak teh putih bergantung pada zat-zat yang terkandung dalam ekstrak teh putih tersebut dan terkait dengan kemurnian ekstrak dan kontaminasi (Depkes, 2000).

Pengujian warna ekstrak

Pengujian warna masing-masing ekstrak dan bubuk teh putih (kontrol) dengan menggunakan *chromameter* terhadap nilai a^* , b^* dan L. Nilai a dari ketiga jenis ekstrak menunjukkan nilai – (negatif), untuk nilai b menunjukkan nilai + (positif), untuk nilai L ekstrak n-heksan memiliki nilai yang paling besar. Menurut Hutching (1999), semakin tinggi kecerahan warna, semakin tinggi nilai L sedangkan untuk notasi a menyatakan warna kromatik campuran merah-hijau dengan nilai + a (positif) dari 0 sampai +100 untuk warna merah dan nilai – a (negatif) dari 0 sampai -80 untuk warna hijau. Notasi b menyatakan warna kromatik campuran biru-kuning dengan nilai + (positif) dari 0 sampai +70 untuk warna kuning dan nilai –b (negatif) dari 0 sampai –80 untuk warna biru. Sedangkan L menyatakan kecerahan warna. Hasil dari pengukuran warna ekstrak dapat dilihat pada Tabel 6, di bawah ini.

TABEL 6
Hasil perhitungan warna ekstrak teh putih

Warna	L*	a*	b*	Hue	TCD	C
Ekstrak n-heksana	34,56	-4,21	8,41	116,60	3,32	9,41
Ekstrak etil asetat	33,78	-5,43	5,62	2,11	2,14	7,81
Ekstrak etanol	33,69	-4,93	3,85	3,56	3,29	6,27

Hasil pengujian *TCD* pada Tabel 6 berkaitan dengan pembuatan ekstrak dan efek pelarut yang digunakan, ekstrak n-heksana dan ekstrak etanol memiliki perbedaan warna yang cukup besar dibandingkan dengan ekstrak etil asetat. Nilai *hue* dari masing-masing ekstrak n-heksana, etil asetat dan etanol adalah 116,60; 134,24; dan 142,12. Menurut standar hubungan *hue* dengan warna sampel (Hutching, 1999), ekstrak n-heksana termasuk dalam kategori yellow (Y) yaitu 90–126, ekstrak etil asetat dan etanol termasuk dalam yellow green 126-162.

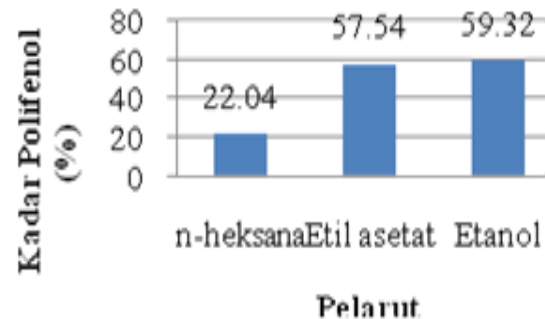
Kadar sisa pelarut

Kadar pelarut yang diperbolehkan untuk bahan pangan maksimal 1% dengan pertimbangan, yaitu tidak bersifat memabukkan (Apriyantono, 2001). Kadar sisa pelarut hanya diujikan pada ekstrak etanol, karena dikhawatirkan ekstrak etanol yang kental masih memiliki kandungan pelarut yang tinggi, sedangkan ekstrak teh putih yang menggunakan pelarut etil asetat dan n-heksana diasumsikan tidak terdapat sisa pelarut. Hasil kadar sisa pelarut ekstrak etanol adalah 17,44% dari berat ekstrak yang diuji, karena kemungkinan pada saat proses penguapan pelarut atau pemisahan pelarut tidak dapat dilakukan secara sempurna, sehingga sebagian pelarut masih tertinggal dan terikat di dalam ekstrak etanol teh putih.

Kadar polifenol

Polifenol adalah senyawa yang tersedia secara alami yang bertanggung jawab terhadap ketajaman rasa dan aroma yang unik (Rohdiana, 2011). Pengukuran total

polifenol pada penelitian ini menggunakan reagen folin-ciocalteu (Shahidi dan Nazek, 2004).



GAMBAR 1

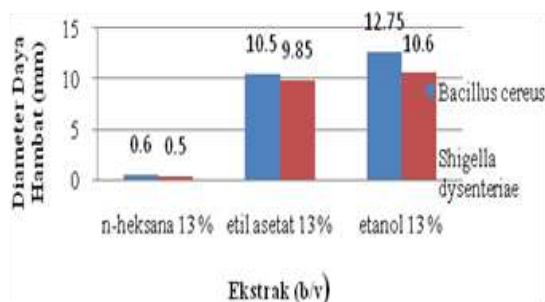
Total polifenol ekstrak teh putih.

Gambar 1 menunjukkan kandungan total polifenol paling tinggi pada ekstrak ekstrak etanol adalah 59,32%; ekstrak etil asetat adalah 57,54% dan ekstrak n-heksana adalah 22,04%, sesuai dengan syarat mutu teh putih RSNi 2013, total polifenol yaitu di atas 17,5%. Tingginya total polifenol pada ekstrak etanol menunjukkan polifenol lebih banyak larut pada pelarut polar.

Pengujian aktivitas antibakteri Perhitungan diameter daya hambat

Pengujian aktivitas antibakteri variasi ekstrak teh putih dilakukan terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae* dengan metode difusi cakram. Suspensi masing-masing bakteri uji, kemudian diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang sebesar 600 nm untuk menyeragamkan absorbansi keseluruhan bakteri uji. Hasil dari pengukuran kekeruhan bakteri dapat dilihat pada Tabel 7.

Pembuatan konsentrasi 13% (b/v), masing-masing ekstrak yang sudah mengental (hasil evaporasi) diencerkan dengan pelarut etanol 96%, pengeceran dilakukan agar ekstrak kental teh putih dapat berdifusi dengan media agar. Hasil pengamatan uji diameter daya hambat antibakteri ekstrak teh putih dapat dilihat pada Gambar 2.



GAMBAR 2

Grafik perbandingan aktivitas antibakteri dengan variasi ekstrak teh putih.

Hasil diameter daya hambat diperoleh dari pengurangan antara zona bening yang terbentuk dengan diameter kertas cakram yang digunakan, yaitu 5,5 mm. Semakin luas diameter zona hambat berarti semakin sedikit jumlah bakteri yang tumbuh. Hasil pengukuran diameter daya hambat variasi ekstrak dengan konsentrasi 13% dapat dilihat pada Tabel 8.

Gambar 2 menunjukkan aktivitas antibakteri oleh ekstrak tanol 13% (b/v), yaitu 12,7 mm ± 0,70 untuk *Bacillus cereus* dan 10,6 mm ± 0,88 untuk *Shigella dysenteriae*, ekstrak etil asetat 13% (b/v),

yaitu 10,5 mm ± 0,28 untuk *Bacillus cereus* dan 9,8 mm ± 0,21 untuk *Shigella dysenteriae*, sedangkan ekstrak n-heksana 13% (b/v), yaitu 0,6 mm ± 0,28 untuk *Bacillus cereus* dan 0,5 ± 0,14 untuk *Shigella dysenteriae*. Pembentukan diameter daya hambat dapat dilihat pada Gambar 3.



GAMBAR 3

Pembentukan diameter daya hambat bakteri.

Pembentukan diameter daya hambat berdasarkan Davis dan Stout (1971), daerah hambatan 20 mm atau lebih termasuk sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm kategori kuat, daerah hambatan 5-10 mm kategori sedang, dan daerah hambatan 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah. Ekstrak etanol 13% (b/v) dan ekstrak etil asetat 13% (b/v) termasuk dalam kategori kuat (10-20 mm), sedangkan ekstrak n-heksana 13% (b/v) termasuk kategori lemah (< 5 mm). Ekstrak etanol 13% (b/v), terhadap *Bacillus cereus* memiliki daya hambat tertinggi yaitu 12,7 mm. Uji kontrol negatif menggunakan pelarut etanol 96% tanpa ekstrak teh putih dan kontrol masing-masing ekstrak teh putih 100%.

TABEL 7

Absorbansi suspensi bakteri

Bahan	Absorbansi	Keterangan	Jumlah Bakteri (CFU/ml)
Mc Farland 1 (MF1)	0,223		± 3 x 10 ⁸
<i>Bacillus cereus</i>	0,246	Sesuai MF1	± 3 x 10 ⁸
<i>Shigella dysenteriae</i>	0,219	Sesuai MF1	± 3 x 10 ⁸

TABEL 8

Hasil pengukuran diameter daya hambat ekstrak teh putih 13% (b/v)

Keterangan	Diameter Daya Hambat Bakteri Uji	
	<i>Bacillus cereus</i> (mm)	<i>Shigella dysenteriae</i> (mm)
Ekstrak n-heksana 13 %b/v	0,6 ± 0,28	0,5 ± 0,14
Ekstrak etil asetat 13 % b/v	10,5 ± 0,28	9,85 ± 0,21
Ekstrak etanol 96% 13 % b/v	12,7 ± 0,70	10,6 ± 0,88

TABEL 9

Diameter daya hambat kontrol (-) dan ekstrak teh putih 100%

Bahan	Diameter daya hambat (mm)	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
Kontrol (-) Etanol 96 %	0	0
Ekstrak n-heksana 13 %	0	0
Kontrol ekstrak etil asetat 100%	12,6±0,91	10 ± 0,70
Kontrol ekstrak etanol 100 %	14,5±0,70	13,6 ± 0,14

TABEL 10.

Total pertumbuhan bakteri kontrol (-) dan ekstrak teh putih 13% (b/v)

Bahan Uji	Total Pertumbuhan Bakteri (CFU/ml)	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
Kontrol (-) etanol	3,5 x 10 ⁷ CFU/ml	3,6 x 10 ⁷ CFU/ml
Ekstrak n-heksana 13 %	1,3 x 10 ⁷ CFU/ml	1,0 x 10 ⁷ CFU/ml
Ekstrak Etil asetat 13 %	5,6 x 10 ⁶ CFU/ml	6,5 x 10 ⁶ CFU/ml
Ekstrak etanol 13 %	4,6 x 10 ⁶ CFU/ml	5,2 x 10 ⁶ CFU/ml

TABEL 11.

Total pertumbuhan bakteri kontrol ekstrak teh putih 100%

Bahan Uji	Total Pertumbuhan Bakteri (CFU/ml)	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
Ekstrak n-heksana 100 %	3,2 x 10 ⁷ CFU/ml	1,3 x 10 ⁷ CFU/ml
Ekstrak Etil asetat 100 %	5,6 x 10 ⁶ CFU/ml	2,2 x 10 ⁶ CFU/ml
Ekstrak etanol 100 %	4,5 x 10 ⁶ CFU/ml	1,5 x 10 ⁶ CFU/ml

Tabel 9 merupakan perlakuan kontrol negatif, yaitu pelarut etanol 96% terhadap aktivitas antibakteri tidak membentuk daerah penghambatan pertumbuhan bakteri. Hasil pengujian dari masing-masing ekstrak teh putih 100% mampu menghambat bakteri uji dengan diameter yang cukup besar, zona hambat ekstrak etanol adalah 14,5 mm untuk bakteri *Bacillus cereus* dan 13,6 mm untuk bakteri *Shigella dysenteriae*, sedangkan zona hambat ekstrak etil asetat adalah 12,6 untuk bakteri *Bacillus cereus* dan 10 mm untuk bakteri *Shigella dysenteriae*, hanya ekstrak n-heksana yang tidak membentuk daerah penghambatan.

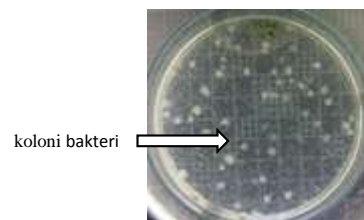
Diameter daya hambat pada golongan bakteri gram positif *Bacillus cereus* mempunyai diameter lebih besar dibandingkan dengan golongan bakteri gram negatif *Shigella dysenteriae*. Hal ini disebabkan karena pada bakteri gram negatif dengan permukaan sel yang licin bersifat hidrofilik sedangkan ekstrak teh putih memiliki sifat hidrofobik (tidak larut air) (Fardiaz, 1992). Selain itu komponen nutrisi yang dibutuhkan bakteri gram negatif untuk pertumbuhan lebih sederhana dibandingkan dengan bakteri gram positif (Pelczar, 1986). Hal ini menyebabkan ekstrak teh putih sebagai zat antibakteri menjadi lebih dominan dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Waktu inkubasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 jam, diduga pada waktu 18-24 jam pertumbuhan bakteri dalam fase stasioner, sesuai penelitian yang dilakukan Retnowati, *et al.* (2011). Adanya aktivitas ekstrak teh putih terhadap pertumbuhan bakteri, khususnya ekstrak etanol dan ekstrak etil asetat teh putih dapat direkomendasikan sebagai bahan baku farmasi.

Total pertumbuhan bakteri

Perhitungan jumlah total bakteri *Bacillus cereus* dan *Shigella dysenteriae* prinsip suspensi bakteri dihomogenkan dengan ekstrak pada media NB, kemudian ditumbuhkan pada media NA merupakan salah satu media yang umum digunakan dalam pengujian bakteri.

Bakteri berkembang biak dengan cara membelah diri dan memperbanyak diri menjadi dua sel yang sama. Pengenceran dilakukan secara bertingkat bertingkat dengan perhitungan desimal yaitu 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10.000; dan 1:100.000 (Fardiaz, 1992). Pengenceran dilakukan untuk mengurangi jumlah bakteri pada suspensi yang diujikan sehingga bakteri yang tumbuh tidak melebihi standar perhitungan koloni yaitu berjumlah antara 30–300 koloni. Jika koloni yang tumbuh >300 adalah TBUD (terlalu banyak untuk dihitung) dan sebaliknya jika koloni yang tumbuh <30 terlalu sedikit untuk dihitung. Adapun data total pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Tabel 10.

Total pertumbuhan bakteri terhadap ekstrak n-heksana 13% (b/v), ekstrak etil asetat 13% (b/v), ekstrak etanol 13% (b/v) diduga mengandung senyawa antibakteri yang bersifat bakteriostatik yaitu dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan perlakuan kontrol (-) berupa pelarut etanol.



GAMBAR 4

Koloni yang terbentuk pada cawan.

Gambar 4 menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh dan menyebar pada media

setelah dinkubasi 24 jam. Koloni yang dihitung berupa titik-titik koloni yang berjauhan. Menurut Fardiaz (1992), koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar di mana jumlah koloninya diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni, dan satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

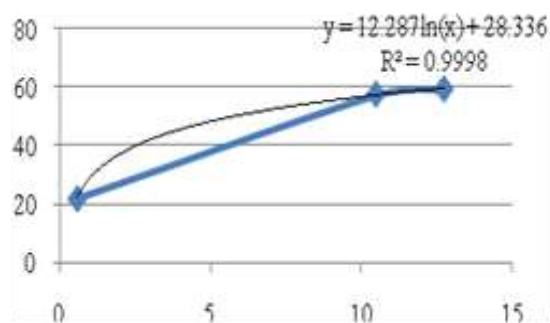
Pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* (gram positif) kontrol (-) pertumbuhannya lebih banyak dibanding variasi ekstrak teh putih konsentrasi 13% (b/v), dan ekstrak etanol 13% (b/v) yang paling sedikit pertumbuhan bakterinya yaitu $4,6 \times 10^6$ CFU/ml, disusul dengan ekstrak etil asetat 13% (b/v), yaitu $5,9 \times 10^6$ CFU/ml dan ekstrak n-heksana 13% (b/v), yaitu $1,3 \times 10^7$ CFU/ml. Hasil ini sesuai dengan hasil uji diameter daya hambat yang menunjukkan ekstrak etanol mempunyai daya hambat terbesar. Begitu pula pada pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* ekstrak etanol 13% (b/v) memiliki pertumbuhan yang paling sedikit, yaitu $5,2 \times 10^6$ CFU/ml, disusul ekstrak etil asetat 13% (b/v), yaitu $6,5 \times 10^6$ CFU/ml dan ekstrak n-heksana 13% (b/v), yaitu $1,0 \times 10^7$ CFU/ml. Perlakuan kontrol (-) bakteri yang tumbuh cukup banyak, hal ini dikarenakan tidak ada aktivitas antibakteri pada kontrol negatif pelarut etanol 96%. Pengukuran total pertumbuhan bakteri dilakukan dengan pengujian terhadap kontrol ekstrak n-heksana 100%, ekstrak etil asetat 100% dan ekstrak etanol 100% pada kedua bakteri tersebut. Hasil dari pengujian total pertumbuhan bakteri kontrol ekstrak tersebut terdapat pada Tabel 11 dibawah ini.

Hasil pengujian kontrol masing-masing ekstrak teh putih 100% berbanding

lurus dengan hasil diameter daya hambat 13% (b/v), kontrol ekstrak n-heksana 100% tidak membentuk zona bening, begitu juga pada hasil TPC yang tumbuh cukup banyak, sedangkan kontrol ekstrak etanol 100% memiliki pertumbuhan yang paling sedikit, disusul dengan kontrol ekstrak etil asetat. Namun, jika dibandingkan dengan diameter daya hambat antara kedua bakteri tersebut, hasil tidak berbanding lurus, karena seharusnya pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* lebih sedikit dengan total pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yaitu $3,2 \times 10^7$ CFU/ml (*Bacillus cereus*) dan $1,3 \times 10^7$ CFU/ml (*Shigella dysenteriae*). Hal ini diduga media uji terkontaminasi dengan kapang dan bakteri lain yang tidak teridentifikasi, karena proses pengujian yang kurang aseptik sehingga begitu banyak koloni yang tumbuh pada media uji.

Korelasi total polifenol dengan aktivitas antibakteri

Kurva korelasi dibuat untuk melihat keterkaitan antara kadar polifenol masing-masing ekstrak teh putih dengan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *B. cereus* dan bakteri *S. dysenteriae*. Koefisien korelasi digunakan untuk menunjukkan hubungan antara dua variable (Sarwono, 2006). Model regresi yang digunakan dipilih dari berbagai model regresi yang dianggap dapat mewakili hasil pengamatan untuk menentukan korelasi kadar polifenol terhadap aktivitas antibakteri dari masing-masing ekstrak teh putih, yaitu model regresi yang memiliki nilai R yang paling besar $\geq 0,75$. Kurva korelasi dapat dilihat pada Gambar 5



GAMBAR 5
Kurva korelasi kadar polifenol dengan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus cereus*.

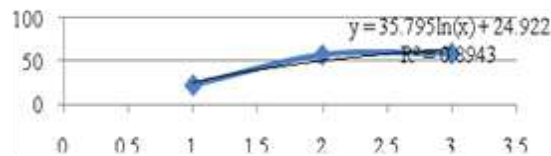
Nilai R^2 yang dibentuk dari kurva adalah 0,9998 dan nilai r yang terbentuk hampir mendekati 1, yaitu 0,9998, artinya kandungan polifenol pada teh putih memiliki interpretasi koefisien korelasi yang sangat kuat terhadap aktivitas antibakteri untuk bakteri *Bacillus cereus*. Pengelompokan interpretasi koefisien korelasi menurut Sarwono (2006), dapat dilihat pada Tabel 12.

TABEL 12.
Kriteria nilai korelasi (r)

No.	Nilai Korelasi	Interpretasi
1.	0	Tidak terdapat korelasi antara dua variabel
2.	> 0-0,25	Sangat lemah
3.	> 0,25-0,5	Cukup
4.	> 0,5-0,75	Kuat
5.	> 0,75-0,99	Sangat kuat
6.	1	Sempurna

Aktivitas antibakteri ditentukan oleh kandungan polifenol yang dimasukkan ke dalam model persamaan logaritmik karena memiliki nilai r yang lebih besar dari persamaan fungsi linear dan eksponensial. Semakin tinggi kandungan polifenol maka aktivitas antibakteri akan semakin tinggi, begitu sebaliknya semakin rendah kandungan polifenol maka aktivitas antibakteri semakin rendah juga. Pada Gambar 6 merupakan

kurva korelasi kandungan polifenol dengan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. dysenteriae*.



GAMBAR 6
Kurva korelasi kadar polifenol dengan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. dysenteriae*.

Nilai R^2 yang terbentuk pada kurva korelasi kandungan polifenol dengan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* adalah 0,8943 sehingga nilai r nya sebesar 0,9456 memiliki interpretasi koefisien korelasi yang sangat kuat. Menurut Sarwono (2006), interpretasi koefisien korelasi sangat kuat berkisar antara >0,75-0,99. Aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh kandungan flavonoid di dalam polifenol tersebut.

KESIMPULAN

Diameter daya hambat yang terbentuk untuk bakteri gram positif yaitu *Bacillus cereus* masing-masing ekstrak 13% (b/v) secara berturut-turut sebesar 0,6 mm, 10,5 mm dan 12,5 mm sedangkan untuk bakteri gram negatif *Shigella dysenteriae* sebesar 0,5 mm, 9,85 mm dan 10,6 mm.

Total pertumbuhan bakteri gram positif *Bacillus cereus* ekstrak n-heksana, etil aseta dan etanol 13% (b/v) yaitu $1,3 \times 10^7$; $5,9 \times 10^6$ dan $4,6 \times 10^5$ CFU/ml serta bakteri gram negatif *Shigella dysenteriae* yaitu $1,0 \times 10^7$; $6,5 \times 10^6$ dan $5,2 \times 10^6$ CFU/ml.

Korelasi kadar polifenol dengan aktivitas antibakteri membentuk nilai $r =$

0,9912 untuk bakteri *B. cereus* dan nilai $r = 0,8874$ untuk bakteri *S. dysenteriae* artinya kandungan polifenol pada teh putih memiliki interpretasi koefisien korelasi yang sangat kuat.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjadjaran untuk dukungan dana dan kesempatan melakukan penelitian. Penelitian ini merupakan bagian dari Program Penelitian Fakultas Sumber Dana PNBPN 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad. 2006. *Anti Inflammatory Activities of Nigella sativa Linn (Kalongi, blackseed)*. Available at: <http://laila-nurhayati.multiply.com/journal> (Diakses pada tanggal 01-Des-2013).
- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 2005. *Official Method of Analysis of Teh Association of Official Analytical of Chemist. Arlington: Teh Association of Official Analytical Chemist, Inc.*
- Apriyantono, A. 2001. *Tinjauan Kritis Status Kehalalan Alkohol (Etanol)*. Available at: www.Indohalal.com/artikel.php?noid=79 (Diakses pada tanggal 28 Desember 2013).
- Asmaliyah, Sumardi dan Musyafa. 2011. *Uji Toksisitas Ekstrak Daun Val Terhadap Serangga Hama Fabricus (Lepidoptera: Noctuidae) Nicolaia atropurpurea Spodotera liture*. Available at: http://forda-mof.org/files/7.5.2010_uji_toksisitas.pdf (Diakses pada 15 Juni 2014).
- Asosiasi Teh Indonesia. 2013. *80 Persen Teh Putih Indonesia Diekspor*. Available at: <http://jabar.tribunnews.com/2013/09/21/80-persen-teh-putih-indonesia-diekspor> (Diakses pada tanggal 18 April 2014).
- Topuz, A., Dincer, C., Torun, M., Tontul, I., Sahin-Nadeem, H., Haznedar, A. and Ozdemir, F. 2014. *Physico-chemical Properties of Turkish Green Tea Powder: Effects of Shooting Period, Shading, And Clone*. *Turky J. Agric For* (2014) 38: 233-241
- Badan Pusat Statistik. 2013. *Produksi Perkebunan Besar menurut Jenis Tanaman, Indonesia (Ton), 1995–2013*. Jakarta.
- Badan Standar Nasional. 2013. *Teh Kering dalam Kemasan*. Terdapat pada: http://sisni.bsn.go.id/index.php?/sni_main/sni/detail_sni/11319 (Diakses pada tanggal 18 April 2014 pukul 22.38 WIB).
- Balai Penelitian Tanaman Industri. 2012. *Karakteristik Teh Putih*. Terdapat pada: <http://balittri.litbang.deptan.go.id/index.php/component/content/article/49-infotekno/159-mengenal-4-macam-jenis-teh> (Diakses pada tanggal 1 April 2014 pukul 22.00 WIB).
- Capucinno, J. G., dan Sherman, N. 2001. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Edisi keenam. Benjamin Cummings. San Fransisco.

- Davis, W. W., and Stout, T. R. 1971. *Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay*. Microbiology 22: 659-665. USA.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan Depkes RI. Jakarta.
- Fardiaz, S, 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Penerbit Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Haryoto. 2003. *Teh dan Khasiatnya Bagi Kesehatan*. Kanisius. Jakarta.
- Hutching, J.B. 1999. *Food Color and Appearance*. Aspen publisher Inc., Maryland.
- Lay, W.B. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium*. Edisi I. Penerbit PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Noorhamdani, Endang, Y., dan Setyawan, H. P. . 2013. *Ekstrak daun teh putih (Camellia sinensis) sebagai antibakteri terhadap Streptococcus mutans secara in vitro*. Majalah Hendra. April 03 (1-11).
- Pelczar, M. J., dan Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press, Jakarta.
- Rayati, D. J., dan Widayat, W. 2009. *More Than a Cup of Tea*. Pusat Penelitian Teh dan Kina. Gambung.
- Retnowati, Y., Bialangi, N., Posangi, N., W. 2011. *Pertumbuhan bakteri Staphylococcus aureus pada media yang diekspos dengan infus daun sambiloto (Andrographis paniculata)*. Saintek, Vol 6, No.2, 2011.
- Rohdiana, D. 2011. *Teh ini menyehatkan*. Penerbit Alfabeta. Bandung.
- Rohdiana, D. 2014. *Teh putih berpotensi melawan virus H5N*. Agro Indonesia, No. 496, 12 Mei 2014, h. 24.
- Rohdiana, D. 2014. Wawancara “RSNI Syarat Mutu Teh Putih”. Kantor PT. Perkebunan Nusantara VIII, Bandung.
- Sarwono, J. 2006. *Metode Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif*. Penerbit Graha Ilmu. Yogyakarta.
- Shahidi, F. dan Nazek, M. 2004. *Phenolich in Food Nutraceuticals*. CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Watson, D. G. 2005. *Analisis Farmasi*. Edisi kedua. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Winarno, F. G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.