

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK CACING TANAH (*Lumbricus rubellus*) TERHADAP PERTUMBUHAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Busman*, Yenita Alamsyah**, Noci Saputri***

* Bagian Laboratorium Mikrobiologi, ** Bagian Departemen Orthodonti, *** Pendidikan Kedokteran Gigi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah

ABSTRAK

Salah satu penyakit infeksi dalam rongga mulut yang merupakan penyakit paling umum terjadi di masyarakat dengan prevalensi tinggi di Indonesia adalah abses periapikal yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengobatan abses dapat dilakukan dengan penggunaan antibiotik. Namun penggunaan antibiotik kimia menimbulkan efek samping dan terjadinya resistensi bila penggunaannya kurang tepat. Masyarakat kini lebih cenderung untuk menggunakan obat dari bahan alami dan melakukan pengobatan secara tradisional seperti penggunaan cacing tanah. Kandungan dari cacing tanah *Lumbricin-I* dapat digunakan sebagai antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai April 2017 di Laboratorium Mikrobiologi Kopertis Wilayah X Sumatera Barat. Jenis penelitian adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan metode *disc diffusion*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata diameter zona hambat pada konsentrasi 10% sebesar 11,78 mm, 20% sebesar 12,95 mm, 40% sebesar 14,64 mm, 80% sebesar 17,32 mm. Diameter rerata zona hambat tertinggi yaitu pada konsentrasi 80%. Hasil uji statistik nilai $p=0,000<0,05$.

Kata kunci: Ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*), *Staphylococcus aureus*, Zona hambat

ABSTRACT

One of the infectious diseases in oral cavity which the most common suffered with high prevalence in Indonesian society were periapical abscess that caused by Staphylococcus aureus. Treatment of the abscess performed with antibiotics administered. However, nowadays the problem that clinician face is expensive price and resistances when the administered inappropriate, and lead to unwanted side effect. Now, people tend to use herbal medicine and performed the treatment traditionally such as utilization of earthworms. Contents of the earthworms (Lumbricin-I) able to used as antibacterial. The aim of this study was to find out the effects earthworm's extract (Lumbricusrubellus) againts Staphylococcus aureus. This reasearch was experimental laboratory with disc diffusion method has been done February until April 2017 in Laboratory of Microbiology Kopertis Wilayah X Sumatera Barat. The result shown inhibitory zone diameter at concentration 10% was 11,78 mm, 20% was 12,95 mm, 40% was 14,64 mm 80% was 17.32 mm The result shown that the highest inhibitory zone diameter at concentration 80% was 17.32 mm. Result of the statictical analysis with p-value= 0,000<0,05.

Key word: Earthworm's extract (*Lumbricus rubellus*), *Staphylococcus aureus*. Inhibitory zone.

PENDAHULUAN

Kesehatan gigi dan mulut merupakan bagian dari kesehatan tubuh secara umum yang mana tidak hanya terkait dengan persoalan estetika, tetapi juga dapat menimbulkan masalah kesehatan yang serius. Data dari *The World Oral Health Report* pada tahun 2008, menyatakan penyakit yang berhubungan dengan gigi dan mulut merupakan penyakit terbanyak di dunia. Penyakit pada gigi dan mulut yang umum terjadi di dunia, yaitu karies gigi dan penyakit periodontal^[1].

Penyakit infeksi merupakan jenis penyakit yang paling banyak diderita oleh penduduk di negara berkembang, termasuk Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri^[2]. Menurut penelitian I Gusti Agung (2013) penyakit infeksi gigi merupakan jenis penyakit di urutan pertama yang di keluhkan masyarakat dan keluhan tersebut berdampak pada merosotnya produktivitas penderita^[3].

Salah satu bakteri penyebab infeksi yaitu *Staphylococcus aureus*. Tanda-tanda khas pada jaringan atau organ tubuh yang terinfeksi oleh bakteri ini yaitu terjadinya peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses^{[4][5]}.

Meningkatnya resistensi terhadap *Staphylococcus aureus* akibat penggunaan antibiotik mendorong semakin pentingnya usaha untuk mendapatkan bahan antibiotik yang murah tersedia secara kontinu dalam jumlah besar dan memiliki semua unsur-unsur yang dibutuhkan untuk pembuatan antimikroba tersebut. Sehingga dirasa perlu untuk dilakukan eksplorasi terhadap bahan aktif yang mampu untuk mengatasi permasalahan tersebut^[6].

Cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) merupakan hewan tingkat rendah yang tidak memiliki tulang belakang (avertebrata) dan bertubuh lunak. Hewan ini ini sangat potensial untuk dikembangkan. Ini disebabkan kandungan gizinya cukup tinggi, terutama kandungan proteinnya yang mencapai 58-78% dari bobot kering^[7].

Cacing tanah mengandung senyawa aktif seperti *Lumbricin-I* yang dapat digunakan sebagai bahan obat terutama sebagai antibakteri. Mekanisme senyawa aktif ini dalam menghambat bakteri dengan membuat pori di dinding sel bakteri sehingga hal ini menyebabkan sitoplasma sel bakteri menjadi terpapar dengan lingkungan luar yang dapat menyebabkan kematian bakteri^[8].

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang dilaksanakan pada bulan Februari 2017 di Laboratorium Mikrobiologi dan Kimia Kopertis Wilayah X (Sumatra Barat, Riau, Jambi, dan Kepulauan Riau) Padang, Sumatera Barat. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain Lemari pengering (oven), pinset, timbangan analitik (Precusa XT 220A, Swiss), cawan petri, ose, plastik wrap, kapas, kain kasa, autoclave, tabung reaksi dan rak, corong, botol gelap 2,5 liter, gunting, wadah, *blender*, rotavator/ *Rotary Evaporator* (*Buchi Rotavapor R-200, Zwitterland*), *spatle*, tabung elemeyer, inkubator, *petridish* (Pyrex, USA), gelas ukur 10 ml, perforator (pelubang media), jangka sorong, kaliper.

Bahan-bahan yang digunakan adalah *Handsocon*, masker, cacing tanah (*Lumbricus rubellus*), biakan bakteri *Staphylococcus aureus*, *lincomycin*, larutan fisiologis (NaCl 0,9%), aquades steril, plastic wrap, aluminium foil, kapas dan kasa, kertas saring *Wathman*, *tissue*, *DMSO*.

Pengambilan Sampel Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) diperoleh dari budidaya cacing tanah di Medan Sumatera Utara

Ekstraksi Senyawa Bioaktif *Lumbricus rubellus*

Cacing 7 kg di bersihkan dari kotoran, dicuci dengan air bersih dan ditiriskan. Selanjutnya, cacing tanah tersebut dikeringkan dibawah sinar matahari sampai kering. Cacing tanah yang telah dikeringkan, setelah itu sampel dihancurkan menggunakan *blender* hingga hancur.

Pembuatan ekstrak ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam cacing tanah ke dalam tabung gelap 2,5 liter dan tuangkan etanol 96% sebanyak 2 liter dengan menggunakan corong kaca. Diaduk dan didiamkan 24 jam dalam suhu kamar. Setelah 24 jam rendaman cacing tanah disaring menggunakan corong kaca dan kertas saring *Whatman* ke dalam tabung *erlemeyer* sampai ampasnya terpisah dan ditambahkan pelarut baru dan diamkan kembali 24 jam kemudian lakukan lagi penyaringan. Maserat dimasukan kedalam labu untuk dievaporasi (diuapkan) dengan *vacum rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak etanol kental dari cacing tanah yang merupakan ekstrak kasar.

Pembuatan Konsetrasi Ekstrak *Lumbricus rubellus*

Konsetrasi ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10%, 20%, 40%, dan 80%. Bahan yang digunakan sebagai pelarut ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) adalah *DMSO*.

Tabel 1. Pembuatan Konsentrasi Larutan Ekstrak Cacing Tanah

Ekstrak Cacing Tanah (gr)	Volume akhir (ml)	Konsentrasi (%)
1	10	10
2	10	20
4	10	40
8	10	80

Pembuatan Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah *Lincomycin* konsentrasi 5%. dilakukan dengan melarutkan *lincomycin* 0,5 gr dalam 10 ml *DMSO*.

Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Indonesia. Pembuatan suspensi bakteri dengan mengambil satu ose koloni biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri disuspensikan didalam tabung reaksi dengan larutan fisiologis (NaCl 0,9%) sebanyak 10 ml, kemudian di vorteks sampai didapatkan kekeruhan.

Uji Efektivitas Bakteri

Metode yang digunakan dalam pengujian efektivitas antibakteri ini adalah *difusi* agar menggunakan kertas cakram. Uji efektivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*), *lincomycin* sebagai kontrol positif dan *DMSO* sebagai kontrol negatif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Siapkan cawan petri yang berisi medium *Mueller Hinton Agar* (MHA). Lalu suspensi mikroba uji ditanamkan secara merata pada *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan *cotton bud* steril yang ditekan pada dinding dalam tabung sampai tidak ada cairan menetes lagi. Kertas cakram dicelupkan ke dalam ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 10%, 20%, 40%, dan 80%, kontrol positif dan kontrol negatif, letakkan kertas cakram diatas permukaan medium yang terdapat biakan bakteri *Staphylococcus aureus* lalu ditekan dengan pinset agar kertas cakram benar-benar menempel pada media. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam didalam inkubator dengan suhu 37°C setelah 24 jam, amati zona hambat yang terbentuk, untuk mngetahui seberapa besar zona hambat sampel dilakukan pengukuran zona inhibisi yaitu daerah jernih pada permukaan *Mueller Hinton Agar* (MHA) disekitar kertas cakram dengan mnggunakan jangka sorong^[9].

Pengamatan Hasil

Diameter zona hambat *Staphylococcus aureus* adalah diameter zona bening yang muncul pada *difusi disk* yang diukur dengan jangka sorong (dalam milimeter). Kekuatan daya hambat bakteri dikategorikan menurut Davis dan Stout (1971) (Tabel.2)^[10].

Tabel.2 Katategori Diameter Zona Hambat Menurut Davis dan Stout (1971)

Diameter (mm)	Kriteria zona hambat
>20	Sangat kuat
10 -19	Kuat
5-9	Sedang
<5	Lemah

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak cacing tanah dengan konsentrasi 10%, 20%, 40%, dan 80% setra kontrol positif dengan menggunakan lincomycin dapat dilihat pada Tabel.3

Tabel.3 Rerata Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dalam Berbagai Konsentrasi Ekstrak Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

Konsentrasi	Rerata (mm)	Kategori
10%	11,78	Kuat
20%	12,95	Kuat
40%	14,64	Kuat
80%	17,32	Kuat
Kontrol (+)	23,80	Sangat Kuat

Tabel.3 menunjukkan bahwa rerata diameter zona hambat tertinggi berada pada konsentrasi 80% yaitu 17,32 mm dengan kategori kuat, sedang rerata diameter zona hambat paling rendah pada konsentrasi 10% yaitu 11,78 dengan kategori kuat.

PEMBAHASAN

Hasil uji statistik yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) memiliki aktivitas antibakteri yang dinilai melalui adanya daerah hambat pertumbuhan pada bakteri uji.

Hasil dari pengujian ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh rerata diameter zona hambat pada konsentrasi 10% adalah 11,78 mm, 20% sebesar 12,95 mm, 40% sebesar 14,64 mm, 80% sebesar 17,32 mm, kontrol (+) sebesar 23,80 mm dan kontrol (-) sebesar 0,00. Rerata diameter zona hambat yang diperoleh dikategorikan menurut Davis & Stout (1976), dimana dikatakan sangat kuat jika diameter >20 mm, kuat 10-20 mm, sedang 5-10 mm, dan lemah <5 mm. Dengan demikian rerata diameter zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) pada konsentrasi 10%, 20%, 40% dan 80% tergolong kategori kuat^[10].

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah *lincomycin*. *Lincomycin* efektif terhadap bakteri gram positif yang bersifat bakteriostatik namun dapat bersifat bakterisid tergantung dari sensitivitas mikroba yang bersangkutan^[11].

Hasil penelitian didapatkan bahwa hambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* berbanding lurus dengan besarnya konsentrasi ekstrak cacing tanah. Konsentrasi 10%, 20%, 40% dan 80% menunjukkan peningkatan respon hambatan semakin kuat. Hal ini disebabkan karena senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak cacing tanah disetiap konsentrasi semakin besar sehingga daya kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri semakin baik pula.

Kemampuan ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan oleh senyawa bioaktif yang terkandung didalamnya, dikenal dengan nama *Lumbricin-I* yang merupakan senyawa peptida disusun oleh asam amino yang lengkap terutama prolin, mampu menghambat bakteri gram negatif, bakteri gram positif, dan beberapa fungi. *Lumbricin-I* menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara membuat pori di dinding sel bakteri sehingga hal ini menyebabkan sitoplasma sel bakteri menjadi terpapar dengan lingkungan luar yang dapat menyebabkan kematian bakteri^{[8][12]}.

Adrian (2002) mengungkapkan bahwa hasil uji kimia, cacing tanah juga mengandung senyawa aktif golongan senyawa alkaloid^[13]. Senyawa alkaloid pada cacing tanah mengandung atom nitrogen dan bersifat basa (pH lebih dari 7) yang juga mempunyai aktivitas antibakteri dan antipiretik. Mekanisme kerja alkaloid dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga dinding sel tidak terbentuk atau tidak terbentuk secara sempurna.

Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Deni (2015) namun dengan menggunakan ekstrak air rebusan cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dimana diberikan perlakuan dengan konsentrasi 10%, 25%, 50%, 75%, dan 100% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi*^[14]. Jika dibandingkan dengan penelitian Deni (2015) nilai yang diperoleh pada penelitian ini berbeda yakni pada konsentrasi 80% menghasilkan rerata diameter zona hambat sebesar 17,32 mm jauh lebih besar dibandingkan dengan penelitian sebelumnya dimana rerata besar zona hambat paling besar yaitu pada konsentrasi 100% hanya sebesar 14,25 mm.

Penelitian yang dilakukan oleh Indriati (2012), dimana konsentrasi yang digunakan pada pengaruh air rebusan cacing tanah berbanding terbalik dengan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Konsentrasi yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%. Rerata zona hambat terbesar didapatkan pada konsentrasi 20% sebesar 14,97 mm dan rerata zona hambat terkecil pada konsentrasi 80% sebesar 7,92 mm^[15]. Dilihat dari hasil penelitian yang diperoleh bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka semakin rendah daya hambat terhadap bakteri tersebut.

Perbedaan hasil yang didapat dari penelitian ini dengan penelitian- penelitian sebelumnya kemungkinan terjadi karena pada penelitian sebelumnya menggunakan ekstrak air rebusan cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) sedangkan pada penelitian ini menggunakan ekstrak etanol cacing tanah. Menurut Brook *et al* (2007) aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kandungan senyawa antibakteri, konsentrasi ekstrak dan jenis bakteri yang dihambat^[16].

Sifat kelarutan dari bahan yang diduga sebagai zat aktif tidak sama. Menurut Hyun *et al* (1998) *cit* Waluyo (2008) *Lumbricin-I* merupakan senyawa peptida mengandung asam amino yang larut dalam air dan pelarut polar lainnya. Sebaliknya alkaloid hanya larut dalam pelarut organik. Hal ini yang menyebabkan terdapat perbedaan besar zona hambat yang terbentuk antara ekstrak air rebusan dan ekstrak etanol cacing tanah, karena pada ekstrak air rebusan cacing tanah hanya *Lumbricin-I* yang terlarut sedangkan pada ekstrak etanol cacing tanah *Lumbricin-I* dan alkaloid terlarut^[17].

Menurut Pelczar (1988) *cit* Indriati (2012) masing-masing bahan aktif antimikroba memiliki mekanisme yang berbeda dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam penelitian ini kerja zat aktif antimikroba cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) tersebut belum diketahui mana yang berpotensi secara pasti dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, karena adanya perbedaan mekanisme kerja bahan aktif cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) tersebut^[15].

Hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa penggunaan cacing tanah yang memiliki kandungan *Lumbricin-I* dan alkaloid dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang merupakan salah satu penyebab penyakit infeksi di rongga mulut.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 10%, 20%, 40% dan 80% tergolong kategori kuat. Diameter zona hambat tertinggi adalah 17,32 mm yaitu pada konsentrasi 80%.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan nilai KHM dan KBM ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap mikroba patogen pada abses periapikal. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efektifitas ekstrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) secara *in-vivo* sehingga didapat konsentrasi yang dapat digunakan secara klinis.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Zarwin, D.S. 2016. *Perbedaan Uji Resistensi Bakteri Staphylococcus aureus Terhadap Obat Antibiotik Amoksisilin dan Siprofloksasin*. Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Andalas. Padang
- [2] Radji, M. 2011. *Buku ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. ECG, Jakarta. pp. 30
- [3] Agung, I.G. 2013. Kerusakan Gigi Merupakan Fokal Infeksi Penyebab Timbulnya Penyakit Sistemik. *Jurnal, Kesehatan Gigi* Vol. 1 No. 1. pp. 63-68.
- [4] Warbung, Y., Vonny N. S., Wowor. N., Jimmy P. 2013. Daya Hambat Ekstrak Spons Laut *Callyspongia sp* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal, Fakultas Kedokteran Gigi Sam Ratulangi*. pp. 1-3
- [5] Haryani, I. G. A.. 2015. Berkumur Ekstrak Daun Cengkeh (*Eugenia Aromaticum*) 4% Dapat Menurunkan Jumlah Koloni Bakteri dan Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Abses Submukus. *Tesis, Studi Ilmu Biomedik Universitas Udayana*. Denpasar. pp.8-14
- [6] Aryadi, I. 2014. Pengaruh Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda Citrifolia L.*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Sebagai Penyebab Abses Periodontal Secara In Vitro. *Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Mahasaraswati*. Denpasar. pp. 12-15
- [7] Khairuman., dan Khairul A. (2009). *Menggeruk Untung dari Beternak Cacing*. Agromedia Pustaka: Jakarta. pp. 1-15
- [8] Suryani, L. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Cacing Tanah (Lumbricus sp)* terhadap Berbagai Bakteri Patogen secara In vitro. *Jurnal, Mutiara Medika* Vol. 10 No. 1:16-21
- [9] Pratiwi, Y. 2012. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Cabai Keriting (*Capsicum annum, L*) Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah*. Padang
- [10] Davis, W.W and Stout, T.R. *Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay*. *Microbiolgi*, 22(4): 659-665
- [11] Amin, L.Z. 2014. Pemilihan Antibiotik yang Rasional. *Jurnal, Medicinus* Vol. 27(3). pp. 42.
- [12] Cho, J.H., Park, C.B., Yoon, Y.G., Dan Kim S.C. 1998. *Lumbricin I* a Novel Praline- Rich Antimicrobial Peptide From The Earthworm: Purification, Cdna Cloning and Molecular Characterization. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Oct 22; 1408 (1): 67-76.
- [13] Adrian, M. 2002. Identifikasi Ekstrak Cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima aspergillus* yang Memiliki Efek Antipiretik Pada Tikus Putih. *Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor*. pp. 1-4.
- [14] Deni, F. 2015. Uji Daya Hambat Ekstrak Air Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella Thypi* Secara In Vitro. *Skripsi, Fakultas Ilmu Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Sanata Dharma*. Yogyakarta. pp. 3-14
- [15] Indriati G, Mimit S, Rina W. 2012. *Pengaruh Air Rebusan Cacing Tanah (Lumbricus rubellus) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia coli*. *Prosiding Semirata BKS PTN-B MIPA 2012*, ISBN 978-602-9115-20-8. pp. 108-113
- [16] Brooks, G. F., J. S. Butel and S. A. Morse. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran Ed 23th*. Jakarta: EGC
- [17] Waluyo, J. 2008. Purifikasi dan Karakteristik Protein Antibakteri Cacing Tanah. *Tesis, Universitas Airlangga: Surabaya*.