

Efektivitas ekstrak etanol biji kurma mesir (*Phoenix dactylifera L.*) sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* secara in vitro

¹Lilia Putri Pratama, ²Marijam Purwanta, ³Ema Qurnianingsih

¹Departemen mikrobiologi kedokteran fakultas kedokteran Universitas Airlangga
Email: liliaputri61@yahoo.com

Abstrak. Kurma (*Phoenix dactylifera L.*) telah dikonsumsi secara luas di seluruh duniadan diketahui memiliki banyak manfaat di bidang kesehatan. Salah satu mafaatnya yaitu sebagai obat terhadap faringitis yang disebabkan oleh bakteri *Streptococcus pyogenes*. Terdapat ±517.000 kematian pertahun yang disebabkan oleh infeksi *Streptococcus pyogenes* dan komplikasinya. Sejauh ini telah banyak studi mengenai manfaat daging kurma, namun manfaat terhadap biji kurma belum banyak diteliti. Maka dari itu penelitian ini bertujuan untuk menguji efek antibakteri ekstrak etanol biji kurma Mesir (*Phoenix dactylifera L.*) pada *Streptococcus pyogenes* secara in vitro dengan uji Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) menggunakan metode dilusi serial dan uji Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) dengan inokulasi pada media agar darah. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1428.57 mg/ml, 714,29 mg/ml, 357.14 mg/ml, 178.57 mg/ml, 89.29 mg/ml, 44,64 mg/ml, 22,32 mg/ml, dan 11,16 mg/ml. Dari penelitian tersebut didapatkan bahwa Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) tidak dapat ditentukan dan nilai Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) sebesar 1428.57 mg/ml. Ekstrak etanol biji kurma Mesir (*Phoenix dactylifera L.*) efektif sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* dengan nilai signifikan 0,002 ($p < 0,05$)

Kata Kunci: biji Kurma Mesir, *Phoenix dactylifera L.*, *Streptococcus pyogenes*, faringitis

Abstract. Dates (*Phoenix dactylifera L.*) are widely consumed in various parts of the world and are known to have many benefits in the health sector. One of them is pharyngitis medication caused by *Streptococcus pyogenes*. There are ±517.000 deaths per year which caused by *Streptococcus pyogenes* infection and its complication. So far there have been many studies on the benefits of date flesh, but the benefits of the seeds have not been widely studied. The aim of this study is to test the anti-bacterial effect of the ethanol extract of Egyptian *Phoenix dactylifera L.* seed on *Streptococcus pyogenes* in vitro by Minimum Inhibitory Concentration test using serial dilution method and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) in blood agar plate inoculates. The concentration used in this study are 1428.57 mg/ml, 714,29 mg/ml, 357.14 mg/ml, 178.57 mg/ml, 89.29 mg/ml, 44,64 mg/ml, 22,32 mg/ml, and 11,16 mg/ml. From this study the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) can not be determined and the Minimum Bactericidal Concentration is 1428.57 mg/ml. Ethanol extract of Egyptian *Phoenix dactylifera L.* seed effective as antibacteri against *Streptococcus pyogenes* with a significant value of 0,002 ($p < 0,05$).

Keywords: date palm seeds, *Phoenix dactylifera L.*, *Streptococcus pyogenes*, pharyngitis.

Pendahuluan

Buah kurma (*Phoenix dactylifera L.*) sudah umum dikonsumsi seluruh dunia dan termasuk 50 komoditas panen paling di Arab dan sekitarnya¹⁹. Kurma sangat penting dalam perekonomian di Negara Mesir dan Negara-negara di Afrika Utara¹⁵. Terdapat 3 jenis kurma yang tersebar di Mesir, yaitu kurma basah, setengah kering, dan kering (Tamar)²⁴. Kurma jenis kering merupakan kurma yang paling tahan lama²⁴. Daging buah *Phoenix dactylifera L.* mengandung polifenol dengan kandungan polifenol tertinggi terdapat dalam varietas kurma Tunisia *Deglet Nour* yang mana kandungan ini dapat

berfungsi sebagai antioksidan. Beberapa kandungan lain dalam daging buah kurma adalah glukosa (81%-88%), serat (5-8,5%), dan sisanya yaitu protein dan lemak¹⁹. Biji kurma mengandung protein dan lemak yang lebih tinggi daripada dagingnya, serta kaya akan serat, fenol, dan antioksidan⁶. Sama halnya seperti pada dagingnya, biji kurma tinggi akan kandungan fenol dan flavonoid yang memiliki efek antioksidan, bahkan kandungan fenol yang terdapat pada biji kurma lebih tinggi daripada yang terdapat pada dagingnya¹⁴. Fenol dan flavonoid juga dapat mencegah

komplikasi diabetes dengan menangkap radikal bebas sehingga dapat mengurangi stress oksidatif intraseluler².

Faringitis, atau yang biasa disebut radang tenggorokan, adalah iritasi dan nyeri yang disebabkan oleh inflamasi pada orofaring dan, atau hipofaring, yang mana mediator inflamasi utamanya adalah bradikinin dan prostaglandin²³. Penyebab paling sering dari radang tenggorokan atau faringitis adalah virus dan *Streptococcus pyogenes*, namun faringitis yang disebabkan oleh streptokokus memberikan komplikasi yang berat baik di awal maupun di akhir¹³.

Streptococcus pyogenes merupakan bakteri gram positif yang menyebabkan infeksi invasif maupun non invasif, supuratif maupun non supuratif, termasuk demam rematik dan glomerulonefritis¹⁶. *Streptococcus pyogenes* dapat mengekspresikan beberapa komponen pada matriksi ekstraseluler yang melekat pada fibronectin (Fn), protein, matriks, atau kolagen. Fibronectin (Fn) inilah yang menjadi salah satu factor virulensi dari streptokokus karena memegang pengaruh besar terhadap pelekatan *Streptococcus pyogenes* pada sel epitel manusia²¹. Protein M juga berperan dalam pelekatan *Streptococcus pyogenes* pada sel tubuh manusia²⁹. *Streptococcus pyogenes* memproduksi beberapa hemolisin, yaitu Streptolisin O, Streptolisin S, streptokinase, DNase, , serta eksotoksin pirogenik (eritrogenik)²⁶.

Beberapa antibiotik telah resisten terhadap *Streptococcus pyogenes*. Resistensi terhadap tetrasiklin ditunjukkan dengan adanya gen resisten tertrasiklin *tetM* dan *tetO*²⁸. Golongan makrolida memiliki angka resistensi paling tinggi, yaitu sebesar 70%, diikuti tetrasiklin, dan seftriakson¹. Presentase resistensi *S. pyogenes* terhadap eritromisin mulai tahun 2000 sampai 2013 mengalami penurunan dari 32.4% ke 7.4%²⁰. Sementara itu, pilihan obat pertama untuk faringitis yang disebabkan oleh *Streptococcus pyogenes* saat ini adalah penicillin¹. Tidak menutup kemungkinan akan resistensi terhadap antibiotik golongan ini di masa mendatang. Maka dari itu, diperlukan antibakteri alternatif untuk *Streptococcus pyogenes* yang salah satunya adalah dari bahan biji kurma

(*Phoenix dactylifera L.*) yang telah dikenal memiliki berbagai manfaat di seluruh dunia.

Bahan dan metode

Lokasi dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Departemen Mikrobiologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga pada bulan Januari – Maret 2019.

Jenis dan rancangan penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian *true experimental* dengan metode dilusi *broth*. Rancangan penelitian menggunakan *randomized post test controlled design*.

Persiapan ekstrak biji kurma mesir (*Phoenix dactylifera L.*)

Pengekstrakan dilakukan oleh Unit Pelaksana Teknis (UPT) Materia Medice Batu, Batu, Jawa Timur. Pengekstrakan dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Dari sebanyak 200 gram ekstrak biji kurma kering diperoleh hasil 70 ml ekstrak. Sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 2857,14 mg/ml.

Persiapan suspensi bakteri *Streptococcus pyogenes*

Bakteri *Streptococcus pyogenes* yang telah dibiakan dan didiamkan semalam dalam inkubator dengan suhu 37° C, kemudian diambil menggunakan ose yang telah disterilkan dan diinokulasi ke medium *Mueller Hinton Broth*. Selanjutnya campuran divortex dan disetarakan dengan larutan standar McFarland 0,5. Apabila kekeruhan suspensi bakteri sama dengan suspensi standar, maka konsentrasi suspensi bakteri adalah 1.5×10^8 CFU/ml¹².

Uji Konsentrasi Hambat Minimal (KHM)

Uji Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dilakukan menggunakan metode dilusi serial dengan konsentrasi 1428.57 mg/ml, 714,29 mg/ml, 357.14 mg/ml, 178.57 mg/ml, 89.29 mg/ml, 44,64 mg/ml, 22,32 mg/ml, dan 11,16 mg/ml. Kemudian dimasukkan 1 ml suspensi bakteri ke dalam masing-masing tabung. Tabung-tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM)

Dua ratus μl hasil dilusi serial dari tiap tabung reaksi yang berisi larutan ekstrak biji kurma Mesir (*Phoenix dactylifera L.*) diinokulasi pada media *blood agar* kemudian diratakan menggunakan *spreader* dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C ⁴.

Hasil

Setelah diinkubasi selama 24 jam hasil Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) tidak dapat ditentukan karena ekstrak keruh dan berwarna gelap (Gambar 1). 200 μl hasil dilusi serial dari tiap tabung reaksi yang berisi larutan ekstrak biji kurma Mesir (*Phoenix dactylifera L.*) diinokulasi pada media *blood agar* kemudian diratakan menggunakan *spreader* dan diinkubasi selama 24 jam. Penanaman hasil dilusi serial pada media *blood agar* setelah diinkubasi selama 24 jam didapatkan bahwa pada konsentrasi ekstrak biji kurma Mesir 1428,57 mg/ml tidak didapatkan pertumbuhan bakteri *Streptococcus*, baik pada replikasi pertama, kedua, dan ketiga (Tabel 1) . Pada replikasi pertama,

terdapat 5 koloni bakteri di *plate* konsentrasi 714,29 mg/ml, 10 koloni bakteri di *plate* dengan konsentrasi 357, 14 mg/ml, 18 koloni di *plate* denganlenn konsentrasi 178,57 mg/ml, 89 koloni bakteri di *plate* dengan konsentrasi 89,29 mg/ml, dan pada *plate* dengan konsentrasi lebih kecil jumlah koloni bakteri terlalu banyak dan tidak merata sehingga tidak dapat dihitung. Pada replikasi kedua, terdapat 1 koloni bakteri di *plate* konsentrasi 714,29 mg/ml, 4 koloni di *plate* dengan konsentrasi 357, 14 mg/ml, 14 koloni di *plate* dengan konsentrasi 89,29 mg/ml, dan pada *plate* dengan konsentrasi lebih kecil jumlah koloni bakteri terlalu banyak dan tidak merata sehingga tidak dapat dihitung. Pada replikasi ketiga, terdapat 1 koloni bakteri di *plate* konsentrasi 714,29 mg/ml, 3 koloni di *plate* dengan konsentrasi 357,14 mg/ml, 19 koloni di *plate* dengan konsentrasi 89,29 mg/ml, dan pada *plate* dengan konsentrasi lebih kecil jumlah koloni bakteri terlalu banyak dan tidak merata sehingga tidak dapat dihitung.



Gambar 1 Hasil Uji Dilusi Ekstrak. (I) Tabung dengan konsentrasi 1428.57 mg/ml (II) Tabung dengan konsentrasi 714,29 mg/ml (III) Tabung dengan konsentrasi 357,14 mg/ml (IV) Tabung dengan konsentrasi 178.57 mg/ml (V) Tabung dengan konsentrasi 89.29 mg/ml (VI) Tabung dengan konsentrasi 44,64 mg/ml (VII) Tabung dengan konsentrasi 22,32 mg/ml (VIII) Tabung dengan konsentrasi 11,16 mg/ml (+) Tabung berisi media dan suspense bakteri (-) tabung berisi media dan ekstrak biji *Phoenix dactylifera L.* Mesir.

Tabel 1. Hasil Hitung Koloni

Replikasi	Kadar (mg/ml)								Kontrol	
	1428,57	714,29	357,1	178,57	89,29	44,64	22,32	11,16	+	-
			4							
1	0	5	10	18	89	∞	∞	∞	∞	0
2	0	1	4	14	∞	∞	∞	∞	∞	0
3	0	1	3	19	∞	∞	∞	∞	∞	0

Analisis Data

Data hasil hitung koloni dianalisis secara analitik menggunakan uji normalitas, homogenitas, dan uji

one way ANOVA didapatkan hasil signifikansi 0,002 ($p < 0,05$) (tabel 2)

Tabel 2. Uji *One Way* ANOVA

Uji <i>One Way</i> ANOVA	Sig
Jumlah koloni bakteri dalam <i>plate</i>	0,002

Pembahasan

Pada uji ini Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) tidak dapat ditentukan karena ekstrak keruh. Menurut³⁰, kekeruhan ekstrak ini disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu kandungan polifenol yang tinggi, adanya enzim pectin-metilesterase, warna ekstrak, dan juga viskositas yang tinggi. Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) didapatkan pada *plate* dengan konsentrasi 1428.57 mg/ml karena pada konsentrasi tersebut tidak didapatkan adanya koloni bakteri. Pernyataan ini didukung jurnal yang ditulis oleh Andrews pada tahun 2001 yaitu Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi terendah antimikroba yang akan mencegah pertumbuhan mikroorganisme setelah organisme tersebut dikultur pada suatu media⁸.

Pada studi sebelumnya diketahui kadar fenol total (*Total Phenolic Content / TPC*) dalam biji kurma sebanyak 2983±91 mg GAE (*Gallic Acid Equivalent*)/100g¹⁸. Dalam penelitian ini digunakan 200 Gram ekstrak kering biji kurma, maka fenol total yang terkandung 5966±91 mg GAE. Sifat senyawa fenol sendiri dapat mengubah sintesis protein sel bakteri dan juga dapat merubah struktur dinding sel bakteri sehingga permeabilitas sel akan meningkat kemudian pertumbuhan sel akan terhambat dan sel akan rusak^{9,11}. Sementara itu kandungan flavonoid total (*Total Flavonoid Content/TFC*) dalam biji kurma sebanyak 1932±65 mg CAE (*Catechin hydrate Equivalent*)¹⁸. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya maka kandungan flavonoid total dalam penelitian ini sebanyak 3864 mg CAE/100g. Flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar sehingga mudah menembus peptidoglikan pada bakteri Gram positif kemudian senyawa ini dapat mengganggu metabolisme intrasel bakteri tersebut^{9,25}.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak biji kurma sebagai antibakteri efektif terhadap bakteri Gram positif seperti *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* dan *Staphylococcus*

epidermis, sementara untuk Gram negatif *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*^{5,17}. Hasil penelitian Al-Daihan dan Bath menunjukkan bahwa baik biji, daun, daging, maupun kulit buah kurma memiliki efek antibakteri yang signifikan dengan ekstrak aseton yang lebih efektif daripada ekstrak metanol⁵. Sementara studi lain menunjukkan bahwa ekstrak metanol lebih efektif daripada ekstrak etanol 70%²².

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian-penelitian sebelumnya adalah pada penelitian ini ekstrak *Phoenix dactylifera L.* Mesir yang digunakan adalah bijinya dan bakteri yang digunakan spesifik adalah *Streptococcus pyogenes*. Sementara itu, penelitian Qadoos *et al.* pada tahun 2017 menggunakan daging buah kurma dan 4 jenis bakteri, yaitu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Pseudomonas aeruginosa*²². Penelitian serupa juga dilakukan oleh Al-Shwyeh pada tahun 2019 namun menggunakan kultivar kurma jenis lain, yaitu kurma Ajwa⁷. Metode yang digunakan dalam penelitian ini juga berbeda dengan penelitian-penelitian sebelumnya. Penelitian Sundar *et al.* pada tahun 2017 menggunakan metode difusi dan bakteri yang digunakan adalah *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*, selain itu konsentrasi ekstrak yang digunakan juga berbeda, yaitu sebesar 1 mg/ml²⁷. Sementara Bentradi *et al.*, juga menggunakan biji kurma sebagai bahan antibakteri namun hanya diambil bahan aktifnya saja, yaitu tannin dan terbukti efektif terhadap *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis*, *F. oxysporum f. sp. canariensis* dan *F. oxysporum f. sp. phaseoli*¹⁰. Selain itu, Abuharfeil *et al.*, pada tahun 1999 mengamati aktivitas antibakteri ekstrak daging kurma (*Phoenix dactylifera L.*) terhadap *Streptococcus pyogenes* baik secara *in vitro* dan *in vivo* dapat menetralkan eksotoksin (*Streptolysin O*) yang dapat menyebabkan hemolisis³.

Kesimpulan

Ekstrak biji *Phoenix dactylifera* L. Mesir terbukti memiliki efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro* dengan nilai signifikan 0,002 ($p < 0,05$). Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) ekstrak biji *Phoenix dactylifera* L. terhadap *Streptococcus pyogenes* tidak dapat diketahui oleh karena ekstrak berwarna gelap dan keruh. Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) ekstrak biji *Phoenix dactylifera* L. terhadap *Streptococcus pyogenes* sebesar 1428.57 mg/ml

Daftar Pustaka

1. Abd El-Ghany, S.M., Abdelmaksoud, A.A., Saber, S.M., Abd El Hamid, D.H., 2015. Group A beta-hemolytic streptococcal pharyngitis and carriage rate among Egyptian children: A case-control study. *Ann. Saudi Med.* 35,377–382.
2. Abdelaziz, D.H.A., Ali, S.A., Mostafa, M.M.A., 2015. *Phoenix dactylifera* seeds ameliorate early diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.* 53,792–799.
3. Abuharfeil, N., Sukhon, S. El, Msameh, Y., & Sallal, A., 1999. Effect of date fruits, *Phoenix dactylifera* L., on the hemolytic activity of streptolysin O. *Pharmaceutical biology*, 37,335–339.
4. Akinyemi, K.O., 2014. Antimicrobial activities of medicinal plants used in folklore remedies in south-western.
5. Al-daihan, S., Bhat, R.S., 2012. Antibacterial activities of extracts of leaf, fruit, seed and bark of *Phoenix dactylifera* 11,10021–10025.
6. Al-Farsi, M.A., Lee, C.Y., 2008. Nutritional and functional properties of dates: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48,877–887.
7. Al-Shwyeh, H.A., 2019. Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Fruit as Potential Antioxidant and Antimicrobial Agents. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 11,1–11.
8. Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1,5–16.
9. Armiaati, I.G.K., 2015. Ekstrak Etanol Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe vera barbadensis* Miller) konsentrasi 100% dapat menurunkan akumulasi plak gigi dan jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*.
10. Bentradi, N., Gaceb-Terrak, R., Benmalek, Y., & Rahmania, F., 2017. Studies On Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Bioactive Molecules from Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Pollens And Seeds. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*.
11. Bouhlali, E. dine T., Bammou, M., Sellam, K., Benlyas, M., Alem, C., Filali-Zegzouti, Y., 2016. Evaluation of antioxidant, antihemolytic and antibacterial potential of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. *J. King Saud Univ. - Sci.* 28,136–142.
12. Dalynn, 2002. McFARLAND STANDARD. Cat. No. TM50-TM60 Mcfarl.
13. Esposito, S., Blasi, F., Bosis, S., Droghetti, R., Faelli, N., Lastrico, A., Principi, N., 2004. Aetiology of acute pharyngitis: The role of atypical bacteria. *J. Med. Microbiol.* 53,645–651.
14. Habib, H.M., Ibrahim, W.H., 2011. Effect of date seeds on oxidative damage and antioxidant status *in vivo*. *J. Sci. Food Agric.* 91,1674–1679.
15. Hafiz, E., Soliman, S., Ahmed, M.M.M., 2006. Molecular Identification of Some Egyptian Date Palm Males by females varieties (*Phoenix dactylifera* L.) Using DNA Markers.
16. Mandell, Douglas, Bennett, 2010, Principles and Practice Infectious Diseases, The Lancet Infectious Diseases.
17. Metoui, M., Essid, A., Bouzoumita, A., Ferchichi, A., 2019. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activity of Tunisian Date Palm Seed 28, 1–8.
18. Mistrello, J., Sirisena, S.D., Ghavami, A., Richard, J., 2014. Determination of the antioxidant capacity, total phenolic and flavonoid contents of seeds from three commercial varieties of culinary dates 3,34–44.
19. Mrabet, A., Jiménez-Araujo, A., Fernández-Bolaños, J., Rubio-Senent, F., Lama-Muñoz, A., Sindic, M., Rodríguez-Gutiérrez, G., 2016. Antioxidant phenolic extracts obtained from secondary Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.) by hydrothermal treatments. *Food Chem.* 196,917–924.
20. Olivieri, R., Morandi, M., Zanchi, A., Tordini, G., Pozzi, G., De Luca, A., Montagnani, F., 2015. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pyogenes* over 14 years in an area of central Italy. *J. Med. Microbiol.* 64,1186–1195.
21. Passali, D., Lauriello, M., Passali, G.C., Passali, F.M., Bellussi, L., 2007. Group A streptococcus and its antibiotic resistance. *Acta Otorhinolaryngol. Ital. organo Uff. della Soc. Ital. di Otorinolaringol. e Chir. Cerv.-facc.* 27,27–32.
22. Qadoos, H. A., Dhafari H. S., Al Marzooqi D. A., Yaqoubi A. I., Kumarappan A., Nazir A., ElSORI D., 2017. Phenolic content and antimicrobial activities of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits and leaves.
23. Renner, B., Mueller, C.A., Shephard, A., 2012. Environmental and non-infectious factors in the

- aetiology of pharyngitis (sore throat). *Inflamm. Res.* 61,1041–1052.
24. Riad, M.,1996. The date palm sector in Egypt. *CIHEAM-Options Mediterr.* 53,45–53.
 25. Salem, M.Z.M., Ali, H.M., El-Shanhorey, N.A., Abdel-Megeed, A., 2013. Evaluation of extracts and essential oil from *Callistemon viminalis* leaves: Antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid contents. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 6,785–791.
 26. Shulman S. T., Tanz R. R. 2003. *Streptococcus pyogenes* (group A *Streptococcus*). Dalam: Long SS, Pickering LK, Prober CG, penyunting. *Principles and practice of pediatric infectious diseases*. Edisi ke-2. Philadelphia: Churchill Livingstone; h.716-8.
 27. Sundar, R.D.V., Segaran, G., Shankar, S., Settu, S., Ravi, L., 2017. Bioactivity of *Phoenix dactylifera* seed and its phytochemical analysis. *International Journal of Green Pharmacy*; 11:1-11
 28. Vela, A.I., Villalón, P., Sáez-Nieto, J.A., Chacón, G., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2017. Characterization of *streptococcus pyogenes* from animal clinical specimens, Spain. *Emerg.*
 29. Wessels, M.R., 2016. Pharyngitis and Scarlet Fever. *Streptococcus pyogenes Basic Biol. to Clin. Manifestations.* 1–15.
 30. Wojdyło, A., Teleszko, M., & Oszmiański, J., 2014. Original article Physicochemical characterisation of quince fruits for industrial use: yield , turbidity , viscosity and colour properties of juices 1818–1824.