

UJI EFEKTIFITAS EKSTRAK DAUN TREMBESI (*Samanea saman* (jacq.) Merr) SEBAGAI ANTIBAKTERI *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*

Ni Ketut Sinarsih, Wiwik Susannah Rita*, Ni Made Puspawati
Program Studi Magister Kimia Terapan, Universitas Udayana, Denpasar, Bali-Indonesia
*susunah_rita@unud.ac.id

ABSTRAK: Penelitian ini dilakukan untuk menentukan efektivitas ekstrak daun trembesi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*, yang meliputi penentuan pelarut terbaik, toksisitas akut terhadap mencit, konsentrasi optimum, serta senyawa yang berperan sebagai antibakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun trembesi memberikan efek penghambatan yang lebih baik dibandingkan ekstrak air, yaitu sebesar 11 mm terhadap *S. aureus* dan sebesar 8,67 mm terhadap *E. coli* pada konsentrasi 4%. Uji toksisitas akut ekstrak etanol pada mencit memberikan hasil LD₅₀ 16000 mg/kg BB/hari, yang masuk dalam kategori tidak toksik. Konsentrasi optimum ekstrak etanol dalam menghambat pertumbuhan bakteri dilakukan secara *in vitro* pada media *Mueller Hinton* dan dianalisis dengan *Duncan Multiple Range Test* dengan hasil 8,3% terhadap *S. aureus* dan 9% terhadap *E. coli*. Pada konsentrasi tersebut, aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun trembesi dapat dikategorikan sedang terhadap *E. coli* dan kuat terhadap *S. aureus*. Uji fitokimia menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang berperan dalam aktivitasnya sebagai antibakteri yaitu alkaloid, steroid, fenol, flavonoid, dan saponin.

Kata Kunci : *Samanea saman*, antibakteri, toksisitas akut, *E. coli*, *S. aureus*

ABSTRACT: This research has been conducted to determine the effect of *Samanea saman* (Jacq.) Merr leaf extract in inhibiting the growth of *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bacteria. The research includes the determination of the best solvent, the acute toxicity testing in mice, the optimum concentrations, and the identification of compounds that influenced the antibacterial activity. The results showed that the ethanol extract of *S. saman* leaves at concentration of 4% gave a better inhibitory effect than the water extract that was 11.00 mm against *S. aureus* and 8.67 mm against *E. coli*. The acute toxicity test of ethanol extract in mice gave LD₅₀ of 16000 mg/kg BW/day indicating that the extract was safe for consumption in the test animal. The optimum concentration of ethanol extract in inhibiting the growth of bacteria on *Mueller Hinton* media was analyzed by *Duncan Multiple Range Test* and it was found to be 8.3% against *S. aureus* and 9% against *E. coli*. Phytochemical testing result indicated the presence of alkaloids, steroids, phenols, flavonoids, and saponins which may influence the antibacterial activities of ethanol extract of *S. saman* leaves.

Keywords: *Samanea saman*, antibacterial, *E. coli*, *S. aureus*

1. PENDAHULUAN

Infeksi merupakan masalah kesehatan yang umum diderita oleh masyarakat akibat adanya pertumbuhan mikroorganisme, salah

satunya bakteri patogen. Bakteri yang paling banyak menimbulkan kasus infeksi pada masyarakat adalah bakteri patogen dari spesies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan *Escherichia coli* (*E. coli*). Penggunaan

antibiotik dalam mengurangi kasus infeksi menyebabkan resistensi bakteri terhadap antibiotik sehingga dibutuhkan alternatif bahan alami yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai antibakteri salah satunya trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr).

Penelitian mengenai potensi trembesi sebagai antibakteri beberapa diantaranya telah dilaporkan, yang mana ekstrak daun trembesi telah diketahui dapat menghambat pertumbuhan mikroba penyebab tuberkulosis [1]. Selain itu, ekstrak air daun trembesi dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*, *S. aureus*, dan jamur *C. albicans* [2].

Potensi pengobatan menggunakan daun trembesi yang selama ini diaplikasikan oleh masyarakat sebagai obat tradisional berbentuk jamu dapat dikembangkan menjadi obat herbal terstandar (OHT). Kriteria obat herbal yang dapat digolongkan sebagai OHT adalah standarisasi bahan baku, memenuhi persyaratan mutu, terujinya khasiat dan keamanan secara ilmiah melalui uji praklinik terhadap hewan uji misalnya mencit ataupun tikus melalui uji toksikologi [3]. Selain itu, efektivitas obat yang akan dikembangkan sebagai OHT sangat dibutuhkan untuk memaksimalkan proses pengolahan dan penggunaan produk.

Informasi ilmiah mengenai kriteria pengembangan ekstrak daun trembesi sebagai OHT belum banyak dilaporkan. Oleh karena itu, maka pada penelitian ini akan dilakukan studi awal pengujian ekstrak daun trembesi yang meliputi penentuan pelarut yang paling baik untuk mengekstraksi daun trembesi, nilai toksisitas akut (LD_{50}) ekstrak daun trembesi, konsentrasi optimum pemberian ekstrak daun trembesi dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*, serta menentukan golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak daun trembesi dari pelarut tertentu yang memiliki aktivitas antibakteri paling baik.

2. PERCOBAAN

2.1 Bahan dan Peralatan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun trembesi segar yang telah dikeringanginkan dan dihancurkan menjadi serbuk, etanol, akuades, kloroform, NaOH, H_2SO_4 , pereaksi Meyer, asam asetat anhidrat, nutrient agar, amoxicillin, meropenem, kertas cakram, mikroorganisme (bakteri *E. coli* dan *S. aureus*), hewan uji (mencit). Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah cawan petri untuk pengujian antibakteri, pinset, labu Erlenmeyer, *micropipette*, gelas ukur, gelas kimia, *blender*, *rotary evaporator*, kain kasa, aluminium foil, kertas saring, kapas, neraca analitik, tabung reaksi, pipet tetes, labu volumetri, mistar, cawan petri, autoklaf, spuit injeksi, jarum oral no.14, neraca analitis, dan timbangan mencit.

2.2 Metode

Penelitian ini menggunakan rancangan deskriptif eksploratif dan eksperimental. Penelitian deskriptif eksploratif meliputi ekstraksi dan identifikasi senyawa metabolit. Penelitian eksperimental meliputi tiga tahapan yaitu Tahap (i) uji aktivitas antibakteri untuk penentuan pelarut terbaik dan konsentrasi hambat minimum (KHM), Tahap (ii) uji toksisitas akut pada mencit untuk menentukan LD_{50} , dan Tahap (iii) penentuan konsentrasi optimum ekstrak daun trembesi sebagai antibakteri *E.coli* dan *S. aureus*.

Ekstraksi daun trembesi

Ekstraksi daun trembesi dilakukan dengan menggunakan dua pelarut yaitu etanol dan air. Daun trembesi yang telah dikeringanginkan sebanyak 500 g digiling hingga membentuk serbuk. Serbuk masing-masing sebanyak 250 g dimasukkan ke dalam dua toples untuk diekstraksi menggunakan etanol dan air. Ekstraksi menggunakan etanol dilakukan dengan menambahkan etanol 96% ke dalam

serbuk, diaduk hingga homogen dan di diamkan 24 jam. Ekstraksi menggunakan air dilakukan dengan menambahkan akuades panas sampai serbuk terendam selama 1 jam sambil diaduk. Campuran disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sampai seluruh pelarut menguap dan diperoleh ekstrak kental.

Pengujian aktivitas antibakteri

Metode pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram pada media *Mueller Hinton*. Kontrol positif yang digunakan pada pengujian *E. coli* adalah Meropenem dengan konsentrasi 0,3% dan pada *S. aureus* adalah Amoxicillin dengan konsentrasi 0,3%. Ekstrak air dan etanol diuji pada konsentrasi 2% dan 4% untuk mengetahui pelarut yang memberikan aktivitas antibakteri lebih baik. Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut dari masing-masing ekstrak.

Pengujian toksisitas akut (LD₅₀)

Pengujian toksisitas akut menggunakan hewan uji mencit putih jantan galur Balb/C, normal dan sehat, usia dewasa (2 bulan), dengan bobot badan 20 - 30 gram. Data yang dikumpulkan pada uji toksisitas akut adalah data kuantitatif yaitu jumlah kematian. Berdasarkan jumlah kematian hewan uji maka dapat ditentukan kisaran dosis toksik yang disebut dengan LD₅₀.

Mencit dibagi menjadi enam kelompok dengan lima kali ulangan yang terdiri dari:

Kelompok kontrol : diberi ekstrak 0 mg/kg bb/hari atau aquades 0,5 mL/ekor/hari

Kelompok I : diberi ekstrak 1000 mg /kg bb/hari

Kelompok II : diberi ekstrak 2000 mg /kg bb/hari

Kelompok III: diberi ekstrak 4000 mg /kg bb/hari

Kelompok IV: diberi ekstrak 8000 mg /kg bb/hari

Kelompok V : diberi ekstrak 16000 mg /kg bb/hari

Ekstrak dengan berbagai konsentrasi untuk masing-masing dosis disiapkan diberikan secara oral pada mencit dengan cara disonde. Pengamatan jumlah kematian akibat gejala toksik dilakukan dalam waktu 24 jam.

Nilai LD₅₀ dihitung dengan bantuan Tabel Weil. Dan dihitung dengan rumus

$$\text{Log (LD}_{50}\text{)} = \text{log } \mathbf{D} + \mathbf{d} (\mathbf{f}+1)$$

D = dosis terendah

d = logaritma kelipatan dosis

f = faktor yang diperoleh dari tabel Thompson dan Weil (dilihat dari banyaknya hewan coba yang mati tiap perlakuan)

Apabila tidak ada mencit yang mati selama 24 jam maka efek racunnya dianggap lemah dan penelitian dilanjutkan selama 7-14 hari. Apabila setelah 7-14 hari tidak ada tanda toksik dan kematian maka dosis tertinggi dianggap LD₅₀ untuk penelitian selanjutnya.

Penentuan konsentrasi optimum

Rancangan penelitian yang digunakan pada penentuan konsentrasi optimum berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas beberapa perlakuan konsentrasi yaitu 0; 0,3; 2,3; 4,3; 6,3; 8,3; 10,3; 12,3; 14,3 untuk *S. aureus*, dan konsentrasi 0, 3, 5, 7, 9, 11 untuk *E. coli*. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali dengan metode dan prosedur sama dengan pengujian antibakteri.

Uji fitokimia

Sebanyak 2 gram ekstrak ditambahkan kloroform dan air dengan perbandingan 1:1, kemudian dikocok dan didiamkan beberapa menit hingga terbentuk dua fase yaitu fase kloroform yang berada di bagian bawah dan fase air berada di bagian atas.

a. Alkaloid

Sampel dalam fase kloroform diambil sebagian kemudian diasamkan dengan H₂SO₄ 2 M. Fraksi asam diambil dan ditambahkan dengan pereaksi Meyer. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih dengan pereaksi Meyer.

b. Uji Flavonoid

Sebagian ekstrak dalam fase air dimasukkan dalam tabung reaksi dan dimasukkan bubuk magnesium serta beberapa tetes asam klorida pekat dan amil alkohol. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga. Uji flavonoid juga dilakukan dengan penambahan NaOH. Adanya perubahan warna menjadi kekuningan menunjukkan hasil positif uji flavonoid.

c. Uji Fenol

Sebagian ekstrak dalam fase air dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan FeCl₃. Timbulnya warna ungu kehitaman menandakan adanya senyawa golongan fenolik

d. Uji terpenoid dan steroid

Sampel dalam kloroform diambil sedikit, dimasukkan ke dalam plat tetes dan dibiarkan sampai kering. Kemudian ditambahkan Pereaksi Liebermann Burcahrd. Terbentuknya warna merah menandakan positif terhadap adanya terpenoid dan terbentuknya warna biru atau hijau menandakan positif adanya steroid.

e. Uji saponin

Sampel dalam fase air dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok secara vertikal selama 10 detik. Terbentuknya busa setinggi 1–10 cm dan tidak hilang dengan penambahan HCl 2 N selama 10 menit menandakan positif saponin.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air dan Etanol

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 1. Secara umum ekstrak etanol memberikan daya hambat yang lebih besar terhadap pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus*.

Etanol merupakan pelarut dengan spektrum yang lebih luas dalam melarutkan senyawa dalam tumbuhan dibandingkan air [4]. Kemampuan tersebut mengakibatkan senyawa-senyawa nonpolar hingga polar yang memiliki aktivitas antibakteri dapat terekstrak dengan lebih baik dan bekerja sinergis sebagai antibakteri. Sedangkan ekstraksi menggunakan air hanya bisa mengekstrak senyawa-senyawa polar sehingga menyebabkan tidak terekstraknya senyawa nonpolar yang berperan secara sinergis sebagai antibakteri [4].

Tabel 1. Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dari Ekstrak Etanol dan Ekstrak Air Daun Trembesi Pada Konsentrasi 2% dan 4%

Bakteri	Diameter zona hambat (mm)					
	Kontrol +	Kontrol -	Ekstrak Etanol		Ekstrak Air	
			2%	4%	2%	4%
<i>E. coli</i>	33	-	-	8	-	-
	32	-	-	9	-	-
	32	-	-	8	-	-
<i>S. aureus</i>	20	-	10,5	13	8	9,5
	20	-	11	14	9	10
	19	-	11,5	14	9	9,5

Kedua ekstrak, memberikan daya hambat yang lebih besar pada bakteri *S. aureus* dibandingkan *E. coli*. Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya perbedaan kompleksitas penyusun dinding sel dari kedua jenis bakteri [5]. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel dengan lapisan peptidoglikan relatif lebih tipis. Selain itu, membran bakteri gram negatif juga mengandung lipopolisakarida (LPS). Polisakarida berperan dalam mencegah masuknya senyawa hidrofobik ke dalam membran sel, sedangkan lipid berperan dalam mencegah masuknya senyawa hidrofilik [5,6].

Dinding sel bakteri Gram positif tersusun oleh struktur lapisan peptidoglikan yang lebih sederhana sehingga senyawa yang ada dalam ekstrak mudah masuk ke dalam sel dan menemukan sasarannya. Adanya kemampuan senyawa antibakteri dalam merusak dinding sel bakteri menyebabkan terganggunya fungsi dinding sel sebagai pemberi bentuk sel dan melindungi sel dari lisis dapat menyebabkan kematian bakteri [5].

3.2 Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Trembesi

Hasil pengamatan pada uji toksisitas dalam waktu 24 jam tidak memberikan respon kematian pada mencit sehingga pengamatan dilanjutkan hingga 14 hari setelah diberikan ekstrak. Setelah 14 hari, tidak ditemukan tanda-tanda toksik bahkan kematian mencit. Berdasarkan hasil tersebut maka dosis tertinggi dapat digunakan sebagai LD₅₀ untuk penelitian selanjutnya [7]. Nilai LD₅₀ ekstrak etanol daun trembesi dapat dikategorikan tidak toksik karena memiliki LD₅₀ > 15000 mg/kg BB/hari.

3.3 Konsentrasi Optimum Ekstrak Etanol Daun Trembesi

Hasil pengujian konsentrasi optimum seperti pada Tabel 2 dan Gambar 1. Berdasarkan hasil pengukuran diameter hambat pertumbuhan bakteri secara umum terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun trembesi maka diameter zona hambat pertumbuhan bakteri semakin besar.

Ekstrak etanol daun trembesi menunjukkan kinerja antibakteri yang tidak stabil pada konsentrasi tertentu. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya efek penghambatan yang lebih besar (tidak berbeda nyata) berdasarkan hitungan statistik menggunakan *Duncan Multiple Range Test* ketika konsentrasi ditingkatkan.

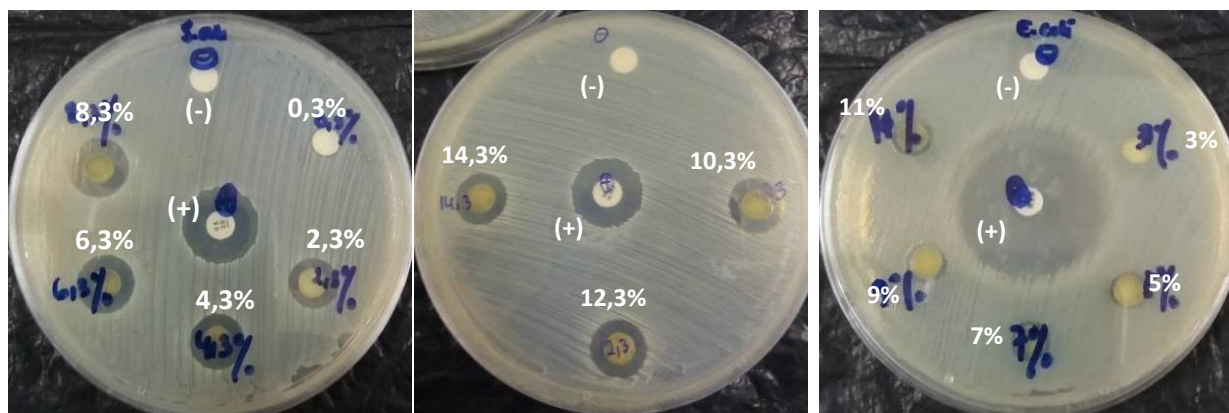
Ketidakstabilan untuk menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi tinggi kemungkinan disebabkan karena senyawa-senyawa metabolit sekunder umumnya memiliki batas kemampuan dalam bioaktivitasnya. Sehingga pada peningkatan konsentrasi tertentu senyawa metabolit sekunder tidak memberikan peningkatan respon yang signifikan atau tidak berbeda nyata.

Etanol merupakan pelarut yang memiliki spektrum luas untuk melarutkan senyawa dalam tumbuhan [4]. Sifat tersebut mengakibatkan senyawa polar ataupun nonpolar yang tidak memiliki aktivitas antibakteri ikut terekstraksi. Pada saat tingkat konsentrasi ekstrak etanol daun trembesi tinggi, konsentrasi senyawa-senyawa yang tidak memiliki aktivitas antibakteri juga semakin tinggi sehingga menyebabkan laju difusi senyawa aktif menjadi berkurang sehingga kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri juga tidak dapat maksimal.

Tabel 2. Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *E. coli* dan *S. aureus* pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Trembesi

Bakteri	Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)
<i>E. coli</i>	Kontrol -	0a*
	Ekstrak 3 %	6,25b
	Ekstrak 5 %	7,92c
	Ekstrak 7 %	8,33d
	Ekstrak 9 %	8,67e
	Ekstrak 11 %	8,83e
<i>S. aureus</i>	Kontrol -	0a
	Ekstrak 0,3 %	6,5b
	Ekstrak 2,3 %	10,7c
	Ekstrak 4,3 %	11,5d
	Ekstrak 6,3 %	12,2e
	Ekstrak 8,3 %	12,9f
	Ekstrak 10,3 %	13,0f
	Ekstrak 12,3 %	13,2f
Ekstrak 14,3 %	13,2f	

*Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan Duncan Multiple Range Test pada taraf 5%



(a)

(b)

Gambar 1

Diameter Zona Hambat Ekstrak Etanol pada Berbagai Konsentrasi Terhadap (a) *S. aureus* (b) *E. coli*

3.4 Senyawa Metabolit Sekunder dalam Ekstrak Etanol daun Trembesi

Kandungan golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol daun trembesi seperti yang disajikan pada Tabel 3.

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun trembesi mengandung beberapa golongan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid, fenol, flavonoid, saponin, namun tidak mengandung senyawa golongan terpenoid.

Tabel 3
Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Trembesi

Uji Fitokimia	Metode	Hasil Reaksi	Kesimpulan
Alkaloid	Culvenor Fitzgerald	Endapan putih	+
Terpenoid	Lieberman Burchard	Warna hijau pekat	-
Steroid	Lieberman Burchard	Warna hijau pekat	+
Saponin	Busa	Busa stabil	+
Fenol	FeCl ₃	Ungu	+
Flavonoid	NaOH, Willstatter	Kuning, Jingga	+

Uji positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pengujian dengan metode Culvenor Fitzgerald menggunakan pereaksi Meyer. Kandungan positif steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau pekat pada pengujian dengan Lieberman Burchard, dimana pengujian ini sekaligus mengetahui dalam sampel tidak terkandung senyawa golongan terpenoid.

Penambahan pereaksi FeCl₃ ke dalam sampel menunjukkan bahwa sampel positif mengandung senyawa fenol yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari kuning kecoklatan menjadi biru-ungu pekat.

Perubahan warna yang pekat pada uji fenol menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun trembesi memiliki kandungan senyawa golongan fenolik yang tinggi.

Pada uji senyawa flavonoid, hasil uji fitokimia menunjukkan adanya perubahan warna sampel dari kuning kecoklatan menjadi kuning terang ketika ditambahkan dengan NaOH 10% dan menjadi jingga ketika diuji dengan pereaksi Willstatter. Terbentuknya warna jingga, merah, atau kuning pada uji Willstatter disebabkan karena terbentuknya senyawa kompleks hasil reduksi senyawa golongan flavonoid [8].

4. KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun trembesi memberikan daya hambat yang lebih baik

daripada ekstrak air dengan nilai LD₅₀ sebesar 16.000 mg/kg BB/hari yang berarti ekstrak tersebut tidak toksik. Konsentrasi optimum pemberian ekstrak etanol daun trembesi dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* adalah sebesar 8,3% (b/v) dan *E. coli* sebesar 9% (b/v). Golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol daun trembesi adalah alkaloid, steroid, fenol, flavonoid, dan saponin.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Kepala Laboratorium dan seluruh staf Mikrobiologi FK Universitas Udayana, Laboratorium Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Laboratorium Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana dan pihak-pihak lainnya yang telah banyak membantu dalam berlangsungnya penelitian ini.

6 DAFTAR PUSTAKA

- [1] Duke, J. A. 1983. *Samanea saman* (Jacq.) Merr, [cited 2015 May 23]. Available from URL: https://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Samanea_saman.html

- [2] Prasad, R. N., Viswanathan, S., Devi, J. R., Nayak, Swetha, V. V. C., Archana, B. R., Parathasarathy, N., and Rajkumar, J. 2008. Short Communication. Preliminary Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Samanea saman*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2(10): 268-270.
- [3] Haryoto, Sujono, T.A., Suhendi, A., Muhtadi. 2015. Pengembangan Potensi *Herbal Medicine* dari Ekstrak Tumbuhan Sala (*Cynometra ramiflora* Linn.) Menjadi Obat Herbal Terstandar. ISSN 2407-9189. 46-63.
- [4] Arifianti, L., Oktarina, R.D., Kusumawati, I. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin Dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Planta Husada*. 2(1) : 1-4.
- [5] Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. 2010. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI-Press
- [6] Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. 1995. *Mikrobiologi Kedokteran*. 20th Edition. Jakarta: EGC. p. 141-144.
- [7] Ngatidjan. 2006. *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Yogyakarta: Bagian Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Kedokteran UGM
- [8] Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, 2nd Edition. Bandung: ITB. p. 47-102.