

## PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL DAUN SALAM (*EUGENIA POLYANTHA*) TERHADAP VIABILITAS SEL LIMFOSIT PADA KULTUR PBMC YANG DIPAPAR $H_2O_2$ 3%

Agus Dody Pranata Suadi Putra<sup>1</sup>, I Gusti Kamasan Nyoman Arijana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

<sup>2</sup>Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

### ABSTRAK

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi menyebabkan kerusakan lingkungan dan perubahan gaya hidup pada manusia. Gaya hidup yang serba instan dan stres yang dialami manusia berpotensi mendapat paparan radikal bebas. Radikal bebas dapat diredam dengan antioksidan. Salam merupakan salah satu tumbuhan yang mengandung antioksidan, yakni flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) terhadap viabilitas Sel Limfosit pada kultur PBMC yang dipapar  $H_2O_2$  3%. Penelitian ini adalah eksperimental murni dengan pola *Post Test Only Control Group Design* pada sampel darah vena secara *in vitro*. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel limfosit pada kultur PBMC sebanyak  $808 \times 10^2$  sel/ml. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*). Variabel terikat pada penelitian ini adalah sel limfosit. Data dianalisis menggunakan uji *One-Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Setelah pengujian selama 30 menit, didapatkan nilai viabilitas tertinggi pada kelompok perlakuan P4 sebesar 86,07%. Pada uji *One-Way ANOVA* diperoleh hasil nilai  $p = 0,001$  ( $p < 0,05$ ) yang artinya terdapat perbedaan signifikan secara statistik terhadap viabilitas sel limfosit pada perlakuan. Hasil uji *Post Hoc* didapatkan adanya perbedaan viabilitas sel limfosit yang bermakna secara statistik pada perlakuan P0 dengan P4, P1 dengan P3, dan P1 dengan P4. Ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) efektif dalam meningkatkan viabilitas jumlah sel limfosit dibandingkan dengan kontrol positif. Konsentrasi 0,0000054 gram/ml merupakan konsentrasi yang paling efektif. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang sama banyak dan konsentrasi yang lebih bervariasi.

**Kata kunci:** ekstrak etanol daun salam, sel limfosit,  $H_2O_2$

### ABSTRACT

The development of science and technology caused destruction of the environment and change of lifestyle in human. Instant of lifestyle and stress that experienced by human potentially gained exposure to free radicals. Free radicals can be muffled using antioxidant. Bay were one of plant that contains antioxidant, especially flavonoid. This study aimed to determine the effect of ethanol extract of bay leaves (*Eugenia polyantha*) against viability of Lymphocyte Cells in PBMC cultures exposed to 3%  $H_2O_2$ . The design of this study is purely experimental with patterns of *Post Test Only Control Group Design* on venous blood samples by *in vitro*. The sample used in this study were lymphocytes in PBMC cultures as much as  $808 \times 10^2$  cells / ml. The independent variable in this study was the ethanol extract of bay leaves (*Eugenia polyantha*). The dependent variable in this study were lymphocytes. Data were analyzed by *One-Way ANOVA* followed by *Post Hoc* test. After observation for 30 minutes, obtained the highest viability value in group P4 (86.07%). In *One-Way ANOVA* test obtained  $p$  value = 0.001 ( $p < 0.05$ ), which means that there is significant difference on the viability of lymphocytes in the experiment. In *Post Hoc* test obtained difference is statistically significant at P0 to P4, P1 to P3, and P1 to P4 group. Ethanol extract of bay leaves (*Eugenia polyantha*) effective in increasing the viability of the lymphocyte cell compared to positive control. The concentration of 0.0000054 g/ml were the most effective concentration. Further research is needed with the homogenous number of sample and a lot more varied concentrations.

**Keywords:** ethanol extract of bay leaves, lymphocyte cells,  $H_2O_2$

### PENDAHULUAN

Perkembangan dan kemajuan teknologi yang pesat menyebabkan hidup manusia yang serba instan dan praktis. Akibatnya terjadi perubahan pola makan dan waktu istirahat, jumlah kendaraan bermotor yang terus meningkat akibat mobilisasi yang harus serba cepat, pengrusakan dan pencemaran lingkungan, serta bertambahnya kawasan industri yang menyumbang polusi udara. Dengan gaya hidup yang serba instan tersebut dan ditambah dengan stres yang dialami oleh manusia itu sendiri berpotensi mengalami paparan radikal

bebas. Sistem imun diperlukan untuk mempertahankan tubuh terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan oleh berbagai bahan dari lingkungan. Salah satu bagian dari sistem imun tersebut adalah limfosit. Limfosit merupakan sistem imun spesifik, yang mana mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya, seperti radikal bebas.<sup>1</sup>

Salah satu radikal bebas yang berpotensi merusak adalah hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) adalah cairan bening yang agak lebih kental daripada air dan

merupakan oksidator kuat.  $H_2O_2$  akan berpotensi merusak senyawa dalam tubuh seperti DNA dan protein akan memberikan dampak terhadap sistem imunitas tubuh.<sup>2</sup>

Radikal bebas dapat diredam dengan menggunakan senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat meredam dampak negatif radikal bebas, termasuk enzim dan protein pengikat logam.<sup>3</sup> Terdapat banyak jenis antioksidan yang ada di alam, salah satunya adalah flavonoid. Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioktivitas sebagai obat. Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau.<sup>4</sup> Salah satu tumbuhan hijau Indonesia yang mengandung flavonoid adalah Salam.

Salam merupakan tanaman asli Indonesia dan tumbuh di wilayah iklim tropis dan subtropis, termasuk di Asia Tenggara dan Cina.<sup>5</sup> Salam biasanya ditanam oleh masyarakat untuk diambil daunnya sebagai bumbu dapur atau penyedap masakan, sedangkan kulit pohonnya digunakan sebagai bahan pewarna jala atau anyaman bambu.<sup>6</sup> Daun salam juga dapat berfungsi sebagai antioksidan, oleh karena mengandung senyawa flavonoid.<sup>7</sup> Daun salam termasuk daun yang mudah didapatkan dan biasanya tersedia banyak di dalam atau dijual di pasar.

Melihat potensi manfaat daun salam yang begitu besar, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) terhadap viabilitas Sel Limfosit pada kultur PBMC yang dipapar  $H_2O_2$  3%. Manfaat dari penelitian ini diharapkan memberikan informasi mengenai manfaat ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) sebagai salah satu antioksidan dalam upaya menurunkan apoptosis jumlah sel limfosit. Selain itu, sebagai acuan bagi masyarakat untuk memahami manfaat daun salam (*Eugenia polyantha*) terhadap paparan oksidan atau radikal bebas, yaitu hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan eksperimental murni acak *in vitro* dengan *Post Test Only Control Group Design* pada sampel darah vena manusia. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana pada bulan Juni 2014 sampai dengan bulan November 2014.

Sampel yang digunakan adalah sel limfosit sebanyak  $808 \times 10^2$  sel/ml yang didapatkan dari kultur PBMC yang distimulasi dengan larutan mitogen (PHA) selama tiga hari. Dengan penghitungan menggunakan rumus Federer, penelitian menggunakan lima kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok dilakukan pengulangan sebanyak lima kali dan tiap sumur berisi 10  $\mu$ l sel limfosit. Kelompok P0 terpapar

PBS1X dan diberikan RPMI-1640 sebagai kontrol negatif, kelompok P1 mendapat paparan  $H_2O_2$  3% dan diberikan RPMI-1640 sebagai kontrol positif, sedangkan pada kelompok perlakuan P2, P3, dan P4 mendapat paparan  $H_2O_2$  3% dan ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dengan 3 variasi dosis pada sekali perlakuan, yaitu masing-masing dengan konsentrasi 0,00000135 gram/ml, 0,0000027 gram/ml, dan 0,0000054 gram/ml, serta diberikan RPMI-1640.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun salam dengan konsentrasi masing-masing yaitu: 0,00000135 gram/ml (P2), 0,0000027 gram/ml (P3), dan 0,0000054 gram/ml (P4). Variabel tergantung adalah jumlah sel limfosit darah vena manusia. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah paparan  $H_2O_2$  3%.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam yang berwarna hijau tua. Bahan utama diperoleh dari Desa Gumbrih, Kabupaten Negara, Provinsi Bali. Bahan kimia yang dipakai untuk ekstraksi adalah etanol 95%, dan kertas saring Whatman No.42. Bahan yang digunakan untuk isolasi limfosit dan kultur sel adalah darah vena perifer dari donor manusia yang sehat, RPMI-1640 (Sigma, USA), akuades, etanol 70%, antibiotik Penicillin-Streptomycin (Roche Indianapolis, USA), *tryphan blue*, larutan mitogen berupa kombinasi *Fetal Bovine Serum* (FBS) dan *Phytohemagglutinin* (PHA) pada konsentrasi 10 $\mu$ g/ml, PBS1X (*Phospat Buffer Saline*),  $NaHCO_3$  anhidrous, heparin, aquabides, dan ficoll.

Instrumen yang digunakan meliputi alat untuk ekstraksi daun salam, yaitu blender kering, peralatan gelas, lemari pendingin, kompor, panci, kain saring, *rotary vacuum evaporator*, *syringe*, membran steril 0.22  $\mu$ m (Sartorius), dan tabung *ependorf*. Instrumen yang digunakan untuk isolasi dan proliferasi sel limfosit manusia adalah tabung *vacutainer* steril, sentrifuse CR412, tabung sentrifuse steril 15 ml disposable (Nunc), 19 mikropipet, mikrotip, vorteks, hemasitometer (Bright-line), mikroskop (Olympus CX 41), lempeng mikrokultur (96 *well*), *laminar flow hood*, dan inkubator ESCO Celculture  $CO_2$ .

Penelitian ini dibagi menjadi empat tahap, yaitu tahap persiapan, tahap isolasi sel limfosit, tahap uji toksisitas akut, dan tahap perlakuan. Pada tahap persiapan dilakukan persiapan bahan dan instrumen penelitian yang diperlukan, termasuk juga mencari dan mengumpulkan daun salam yang berwarna hijau, dan membuat ekstrak etanol daun salam. Pada tahap isolasi sel limfosit dilakukan pengambilan darah dari pembuluh vena perifer manusia sebanyak 5 ml. Kemudian dilakukan isolasi sel limfosit dari sel-sel darah lainnya dengan menambahkan PBS1X dengan perbandingan 1:1. Lalu tambahkan campuran darah dan PBS1X tadi (1:1) dengan larutan ficoll (Histopaque) dan dilakukan pemusingan (sentrifuse). Setelah itu,

aspirasi perlahan layer tengah campuran tersebut hitung volumenya. Tambahkan PBS1X dengan perbandingan 1:1 dan lakukan kembali pemusingan (sentrifuse). Setelah selesai buang supernatant dan akan didapatkan bagian PBMC. Lalu tambahkan FBS dan PHA pada PBMC dan didiamkan selama 3 hari di dalam inkubator. Setelah itu dicat menggunakan *tryphan blue* dan dihitung jumlah proliferasi sel limfosit.

Pada tahap uji toksisitas akut, ekstrak etanol daun salam diambil sebanyak 0,054 gram, lalu diencerkan menggunakan akuades lalu diencerkan menggunakan akuades sampai volume mencapai 980  $\mu$ l dan dilarutkan menggunakan tween 20% sebanyak 20  $\mu$ l. Lakukan pengenceran kembali pada ekstrak etanol daun salam dengan mengambil 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l (perbandingan 90  $\mu$ l air dan 10  $\mu$ l) dari ekstrak telah diencerkan sebelumnya. Setelah itu, siapkan sumur atau pelat uji sebanyak empat sumur, kemudian isikan dengan medium yang berupa *phosphate buffer saline (PBS1X)* sebanyak 979  $\mu$ l pada 3 sumur atau pelat uji dan 980  $\mu$ l pada sumur atau pelat uji ke-4 sebagai kontrol. Tambahkan sel limfosit pada masing-masing sumur atau pelat uji sebanyak 20  $\mu$ l. Kemudian, tambahkan ekstrak etanol daun salam yang telah mengalami pengenceran kembali kedalam 3 sumur atau pelat uji sebanyak 1  $\mu$ l, sedangkan pada kontrol tidak diberikan. Lalu, masukkan sumur atau pelat uji kedalam inkubator dan diamkan selama 1 x 24 jam. Lakukan pengecatan pada sel limfosit dan hitung jumlah sel limfosit yang hidup dan mati.

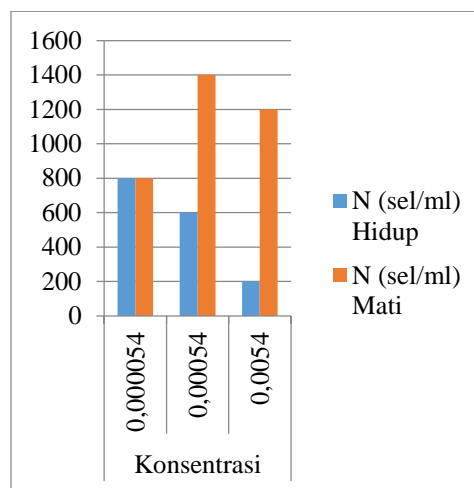
Pada tahap perlakuan, dilakukan pembagian sel limfosit menjadi 5 kelompok (P0, P1, P2, P3, P4), yang masing-masing mendapatkan sel limfosit sebanyak 10  $\mu$ l. Kelompok P0 terpapar PBS1X sebanyak 5  $\mu$ l dan diberikan medium RPMI-1640 sebanyak 485  $\mu$ l, kelompok P1 mendapat paparan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% sebanyak 0,284  $\mu$ l dan diberikan medium RPMI-1640 sebanyak 489,716  $\mu$ l, sedangkan pada kelompok P2, P3, dan P4 mendapat paparan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% sebanyak 0,284  $\mu$ l, medium RPMI-1640 sebanyak 484,716  $\mu$ l dan ekstrak etanol daun salam sebanyak 5  $\mu$ l dengan 3 variasi dosis pada sekali perlakuan. Diamkan selama 30 menit di dalam inkubator dan selanjutnya hitung jumlah sel limfosit yang hidup dan mati dengan menggunakan pengecatan *tryphan blue* pada kamar hitung.

Data yang diperoleh dianalisis dengan melakukan analisis analitik, yaitu dengan uji normalitas dan homogenitas serta uji *One Way Anova* untuk mengetahui efek perlakuan. Penelitian ini telah mendapatkan kelaikan etik dari Komite Etik Litbang FK UNUD/RSUP Sanglah Nomor: 370/UN.14.2/Litbang/2014.

## HASIL

Hasil dari uji toksisitas akut disajikan dalam **Gambar 1**. Dari hasil pengujian toksisitas akut, pada konsentrasi ekstrak 0,000054 gram/ml

didapatkan jumlah sel yang hidup sebanyak 800 sel/ml dan jumlah sel yang mati sebanyak 800 sel/ml. Pada konsentrasi ekstrak 0,00054 gram/ml diperoleh jumlah sel yang hidup sebanyak 600 sel/ml dan jumlah sel yang mati sebanyak 1400 sel/ml. Sedangkan, pada konsentrasi ekstrak 0,0054 gram/ml didapatkan jumlah sel yang hidup sebanyak 200 sel/ml dan jumlah sel yang mati sebanyak 1200 sel/ml. Sehingga dari hasil pengujian didapatkan LD<sub>50</sub> pada konsentrasi ekstrak sebesar 0,000054 gram/ml.

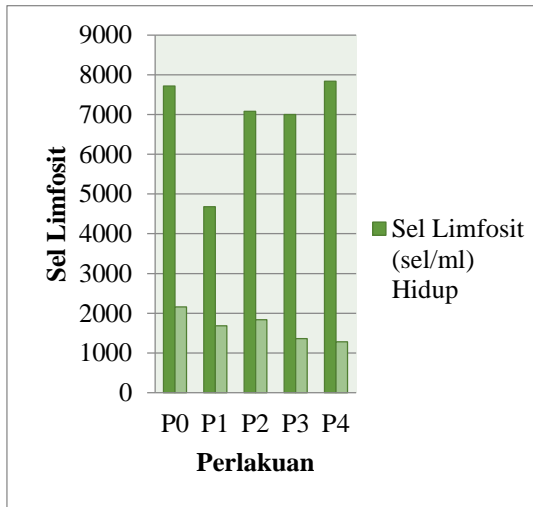


**Gambar 1.**

Grafik Hubungan Konsentrasi dengan Jumlah Sel Limfosit pada Uji Toksisitas Akut

Hasil pengujian pemberian ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) pada sel limfosit yang dipapar oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% disajikan pada **Gambar 2**. Pada kelompok kontrol negatif (P0), jumlah sel limfosit yang hidup sebanyak 7720 sel/ml dan jumlah sel limfosit yang mati sebanyak 2160 sel/ml, sedangkan pada kelompok kontrol positif (P1) jumlah sel limfosit yang hidup sebanyak 4680 sel/ml dan jumlah sel limfosit yang mati sebanyak 1680 sel/ml. Pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dengan konsentrasi 0,00000135 gram/ml (P2), jumlah sel limfosit yang hidup sebanyak 7080 sel/ml dan jumlah sel limfosit yang mati sebanyak 1840 sel/ml. Pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dengan konsentrasi 0,0000027 gram/ml (P3), jumlah sel limfosit yang hidup sebanyak 7000 sel/ml dan jumlah sel limfosit yang mati sebanyak 1360 sel/ml. Sedangkan pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dengan konsentrasi 0,0000054 gram/ml (P4), jumlah sel limfosit yang hidup sebanyak 7840 sel/ml dan jumlah sel yang mati sebanyak 1280 sel/ml. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa jumlah sel limfosit hidup tertinggi pada kelompok perlakuan P4 dan jumlah sel limfosit hidup terendah pada kelompok perlakuan P3. Sedangkan jumlah

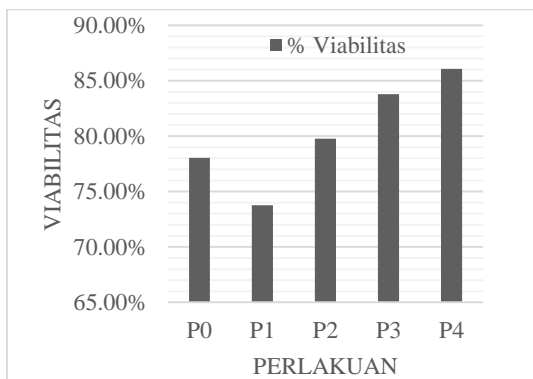
kematian sel limfosit tertinggi pada kelompok perlakuan P2 dan jumlah kematian sel limfosit terendah pada kelompok perlakuan P4.



**Gambar 2.**

Grafik Hubungan Jumlah Sel Limfosit dengan Perlakuan

Persentase viabilitas sel limfosit yang hidup pada pengujian ini disajikan dalam **Gambar 3**. Pada kelompok P0 sebesar 78,04%, kelompok P1 sebesar 73,76%, kelompok P2 sebesar 79,76%, kelompok P3 sebesar 83,78%, dan kelompok P4 sebesar 86,07%. Sehingga dari data tersebut didapatkan bahwa persentase viabilitas sel limfosit tertinggi pada kelompok perlakuan P4 dengan konsentrasi 0,0000054 gram/ml.



**Gambar 3.**

Grafik Persentase Viabilitas Sel Limfosit dengan Perlakuan

## DISKUSI

Dari hasil uji analisis *Post Hoc* didapatkan bahwa pada perlakuan P0 dengan P4 ( $p=0,010$ ), P1 dengan P3 ( $p=0,003$ ), dan P1 dengan P4 ( $p=0,001$ ) mempunyai nilai  $p < 0,05$  yang berarti bahwa pasangan perlakuan tersebut memiliki perbedaan viabilitas sel limfosit yang signifikan secara statistik. Dapat dikatakan bahwa perlakuan yang mendapat paparan  $H_2O_2$  3% dan ekstrak etanol daun

salam (*Eugenia polyantha*) dengan masing-masing konsentrasi 0,0000027 gram/ml dan 0,0000054 gram/ml memiliki perbedaan yang signifikan secara statistik dibandingkan kontrol yang hanya diberikan paparan  $H_2O_2$  3% yang berarti konsentrasi tersebut efektif mempertahankan sel limfosit dari kematian karena paparan  $H_2O_2$  3%. Hasil penelitian juga menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara perlakuan yang hanya mendapat paparan PBS1X dengan perlakuan yang mendapat paparan  $H_2O_2$  3% dan ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) dengan konsentrasi 0,0000054 gram/ml.

Peningkatan viabilitas sel limfosit pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) disebabkan oleh kandungan zat aktif yang terdapat pada ekstrak tersebut. Daun salam memiliki banyak kandungan zat aktif, tetapi kandungan zat aktif flavonoid dalam ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) yang diduga memiliki potensi sebagai pelindung sel limfosit dari kematian yang disebabkan oleh paparan  $H_2O_2$  3%. Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Flavonoid dalam tubuh manusia berfungsi sebagai antioksidan. Selain itu, flavonoid dapat meningkatkan sistem imunitas sebagai antiinflamasi, analgesik, dan anti bakteri.<sup>6</sup> Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon.<sup>7</sup>

Radikal bebas yang dihasilkan oleh hidrogen peroksida akan bereaksi dengan atom yang berasal dari pelepasan atom H oleh gugus OH dari golongan flavonoid. Hal tersebut dapat terjadi karena ikatan O dan H pada gugus OH memiliki energi disosiasi paling kecil, sehingga atom H pada gugus tersebut mudah terlepas sehingga akan membentuk air ( $H_2O$ ). Sedangkan yang kehilangan atom hidrogen beresonansi menuju ke kestabilan reaksi, namun dengan adanya cincin benzena ( $C_6O_6$ ), maka radikal tersebut akan terperangkap pada cincin tersebut dengan mengalami resonansi secara terus menerus di dalam cincin, sehingga kereaktifan dari radikal bebas tersebut dapat berkurang.<sup>8</sup> Sehingga flavonoid akan mengubah atau menguraikan hidrogen peroksida menjadi senyawa yang tidak berbahaya, yaitu menjadi air dan oksigen. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian, di mana pada kelompok perlakuan P4 lebih efektif dalam meningkatkan viabilitas sel limfosit terhadap paparan hidrogen peroksida dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak pada kelompok perlakuan lainnya.

## SIMPULAN

Ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) mampu meningkatkan viabilitas sel

limfosit dari paparan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Viabilitas sel limfosit yang mendapat paparan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% lebih tinggi pada kelompok yang mendapat ekstrak etanol daun salam dibandingkan dengan yang tidak mendapatkan ekstrak etanol daun salam.

Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan konsentrasi ekstrak etanol daun salam (*Eugenia polyantha*) yang lebih bervariasi, dan juga pada kondisi *in vivo* untuk melihat pengaruhnya secara langsung dalam metabolisme tubuh sekaligus membuktikan hasil penelitian ini. Baiknya perhitungan sel limfosit yang hidup menggunakan metode MTT agar perhitungan lebih akurat.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Baratawidjaja, Karnen G., Rengganis, Iris. *Imunologi Dasar Edisi ke Sembilan*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI. 2010. h 29-95.
2. Handoko E, Sumilat W. "Metabolisme Hidrogen Peroksida dan Peranannya pada Infeksi telinga." *Jurnal ORLI Edisi II*. 2009. h 1-14.
3. Pangkahila W. *Anti-Aging Medicine, Memperlambat Penuaan Meningkatkan Kualitas Hidup*. Jakarta: Penerbit Buku Kompas. 2007. h 106-132.
4. Octavia JD. Pengoptimuman Ekstraksi Flavonoid Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) dan Analisis Sidik Jari dengan Kromatografi Lapis Tipis [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor. 2011.
5. Ekawati, Annisa R. Potensi Antioksidasi Daun Salam (*Eugenia polyantha* Wight.) Pada Lingkungan Agrobiofisik yang Berbeda [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor. 2007.
6. Lajuck P. Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) Lebih Efektif Menurunkan Kadar Kolesterol Total dan LDL Dibandingkan Statin pada Penderita Dislipidemia [tesis]. Bali: Universitas Udayana. 2012.
7. Redha A. "Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis." *Jurnal Belian Vol. 9 No. 2 Sep*. 2010. h 196-202.
8. Ningsih N. "Pengaruh Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) Terhadap Respon Potensial Membran Sel Telur Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) Dalam Air Tercemar Senyawa Hidrogen Peroksida." *Jurnal Fisika UB*. 2013. h 17.