

**FRAKSINASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA TANIN
PADA DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.)**

Elok Kamilah Hayati, A. Ghanaim Fasyah, dan Lailis Sa'adah

*Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Jl. Gajayana 50 Malang*

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang fraksinasi dan identifikasi senyawa tanin dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Isolasi senyawa tanin dari daun belimbing wuluh dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut aseton : air (7:3) selama 3x24 jam dengan bantuan shaker, kemudian dilakukan fraksinasi. Pemisahan senyawa tanin dari ekstrak dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) analitik untuk mencari eluen terbaik dengan variasi eluen yaitu *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5), etil asetat : kloroform : asam asetat 10% (15:5:2), asam asetat glasial : H₂O : HCl pekat (Forestal) (30:10:3), metanol : etil asetat (4:1), etil asetat : metanol : asam asetat (6:14:1), toluen : etil asetat (3:1), kemudian dilanjutkan pemisahan dengan KLT preparatif. Identifikasi senyawa tanin dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dari daun belimbing wuluh mengandung senyawa tanin, didukung dari uji fitokimia dari ketiga reagen menunjukkan positif mengandung senyawa tanin. Eluen terbaik dalam pemisahan senyawa tanin dengan KLT analitik adalah *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5) yang dapat digunakan dalam pemisahan dengan KLT preparatif. Eluen ini memisahkan 3 noda dengan nilai R_f 0,53; 0,61; dan 0,68. Berdasarkan hasil analisis spektrofotometer UV-Vis, isolat 2 dengan nilai R_f 0,61 memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 331 nm. Hasil identifikasi dengan FTIR menunjukkan serapan-serapan yang spesifik dari senyawa tanin seperti rentangan asimetri OH pada bilangan gelombang 3372,4 cm⁻¹, overtone aromatik pada bilangan gelombang 2071,8 cm⁻¹, rentangan cincin aromatik pada 1625,8 cm⁻¹ dan benzena pada 782,5 cm⁻¹, sehingga senyawa tanin yang diduga adalah flavan-3,6,7,4',5'-pentaol atau flavan-3,7,8,4',5'-pentaol.

Kata kunci : daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L), tanin, kromatografi lapis tipis (KLT), spektrofotometer UV-Vis, spektrofotometer FTIR

ABSTRACT

Fractionation of tannic compound from star fruit leaves was conducted by maseration using acetone : water (7:3), and analytical and preparative thin layer chromatography using a variety of eluents. The isolates obtained were identified using UV-Vis and FT-IR Spectrophotometer.

The best eluent for both analytical and preparative TLC was found to be *n*-butanol : water : acetic acid (4:1:5), which gave three isolates with R_f of 0.53, 0.61, and 0.68. The second isolate (R_f = 0.61), showed a maximum absorption at 331 nm on the UV-Vis spectra. Its IR spectra showed specific absorptions such as OH-assymmetric stretch (3372.2 cm⁻¹), aromatic overtone (2071.8 cm⁻¹), and aromatic and benzene stretches at 1625.8 cm⁻¹ and 782.5 cm⁻¹ respectively. These spectra suggest that the tannic compound was either flavan pent-3,6,7,4',5'-ol or flavan pent-3,7,8,4',5'-ol.

Keywords : star fruit leaves (*Averrhoa bilimbi* L), tannic, thin layer chromatography, UV-Vis Spectrophotometer, and FT-IR Spectrophotometer

PENDAHULUAN

Penemuan berbagai senyawa obat baru dari bahan alam semakin memperjelas peran penting metabolit sekunder tanaman sebagai sumber bahan baku obat. Metabolit sekunder adalah senyawa hasil biogenesis dari metabolit primer. Umumnya dihasilkan oleh tumbuhan tingkat tinggi, yang bukan merupakan senyawa penentu kelangsungan hidup secara langsung, tetapi lebih sebagai hasil mekanisme pertahanan diri organisme. Kandungan senyawa metabolit sekunder telah terbukti bekerja sebagai derivat antikanker, antibakteri dan antioksidan, antara lain adalah golongan alkaloid, tanin, golongan polifenol dan turunannya.

Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) merupakan salah satu jenis tanaman yang sering digunakan sebagai obat tradisional. Tanaman ini banyak dimanfaatkan mengatasi berbagai penyakit seperti batuk, diabetes, rematik, gondongan, sariawan, sakit gigi, gusi berdarah, jerawat, diare sampai tekanan darah tinggi.

Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin, triterpenoid dan tanin (Faharani, 2009; Hayati, *et al.*, 2010). Bahan aktif pada daun belimbing wuluh yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanin. Tanin merupakan suatu senyawa fenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil untuk membentuk kompleks kuat yang efektif dengan protein dan beberapa makromolekul (Horvart, 1981). Tanin terdiri dari dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Kedua jenis tanin ini terdapat dalam tumbuhan, tetapi yang paling dominan terdapat dalam tanaman adalah tanin terkondensasi. Kadar tanin yang tinggi pada daun belimbing wuluh muda sebesar 10,92% (Ummah, 2010).

Secara kualitatif pengujian fitokimia senyawa tanin terhadap ekstrak aseton-air (7:3) daun belimbing wuluh dengan reagen FeCl_3 , gelatin dan campuran formalin : HCl menunjukkan adanya golongan senyawa tannin. Ekstrak tannin pada daun belimbing wuluh mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, (Hayati, *et al.*, 2009), *Pseudomonas fluores-*

cens dan *Micrococcus luteus* (Hayati, *et al.*, 2010). Adanya potensi aktif terhadap beberapa bakteri dapat dimanfaatkan sebagai obat diare dan pengawet alami.

Tanin dapat diisolasi dari daun belimbing wuluh menggunakan metode maserasi, sedangkan salah satu cara untuk memisahkan senyawa tannin adalah dengan kromatografi lapis tipis preparatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui eluen terbaik dalam pemisahan senyawa tanin dari daun belimbing wuluh dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan mengetahui jenis senyawa tanin yang terdapat dalam daun belimbing wuluh.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah daun belimbing wuluh, dipilih daun muda yang segar dan diambil diujung ranting dari daerah Malang. Bahan-bahan kimia yang digunakan berderajat pa meliputi: aseton, akuades, asam askorbat 10 mM, kloroform, etil asetat, gelatin, formaldehid 3 %, natrium asetat, HCl pekat, FeCl_3 1 %, FeCl_3 5 %, toluen, ferri sulfat, asam asetat glasial, asam asetat, n-butanol, metanol, NaOH 2 M, AlCl_3 5 %, AlCl_3 1 %, H_3BO_3 , pelet KBr, plat KLT silika G60 F₂₅₄.

Peralatan

Alat penelitian yang digunakan pada penelitian ini meliputi seperangkat alat gelas, vacuum rotary evaporator, bejana pengembang, lampu UV 254 dan 366 nm, seperangkat alat UV-Vis merk Shimadzu, seperangkat alat FTIR merk IR Buck M500 Scientific.

Cara Kerja

Daun belimbing wuluh yang muda dicuci bersih dengan air dan diiris kecil-kecil kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 30-37 °C selama 5 jam dan diblender sampai diperoleh serbuk. Hasil yang diperoleh digunakan sebagai sampel penelitian.

Serbuk daun belimbing wuluh ditimbang sebanyak 50 gram kemudian direndam dengan 400 mL pelarut aseton : air (7:3) dengan penambahan 3 mL asam askorbat 10 mM.

Ekstrak tanin dipekatkan dengan menggunakan vakum rotary evaporator dan pemanasan di atas waterbath pada suhu 40-50°C. Cairan hasil ekstrak kemudian diekstraksi dengan kloroform (4x25 mL) menggunakan corong pisah sehingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan kloroform (bawah) dipisahkan dan lapisan air 1 (atas) diekstraksi dengan etil asetat (1x25 mL) dan terbentuk 2 lapisan. Lapisan etil asetat 1 (atas) dipisahkan dan lapisan air 2 (bawah) dipekatkan dengan vacuum rotary evaporator (Makkar, 1998).

Pada pemisahan dengan KLT analitik digunakan plat silika G 60 F₂₅₄ yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C selama 10 menit. Masing-masing plat dengan ukuran 1 cm x 10 cm. Ekstrak tanin ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusikan dengan fase gerak toluen : etil asetat (3:1) dengan pendeteksi ferri sulfat (Yuliani, 2008), forestal (asam asetat glasial : H₂O : HCl pekat) (30:10:3) (Nuraini, 2002), etil asetat : metanol : asam asetat (6:14:1) dengan pendeteksi aluminium klorida 5% (Olivina, 2005), *n*-butanol : asam asetat : air (4:1:5), metanol : etil asetat (4:1) dengan pendeteksi AlCl₃ 1% (Lidyawati, 2006), etil asetat : kloroform : asam asetat 10% (15:5:2). Setelah gerakan larutan pengembang sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda yang terbentuk masing-masing diukur harga R_f nya, selanjutnya dengan memperhatikan bentuk noda pada berbagai larutan pengembang ditentukan perbandingan larutan pengembang yang paling baik untuk keperluan preparatif. Noda yang terbentuk diperiksa dengan lampu UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Pada pemisahan dengan KLT preparatif digunakan plat silika G 60 F₂₅₄ dengan ukuran 10 cm x 20 cm. Ekstrak pekat hasil ekstraksi dilarutkan dengan aseton-air, kemudian ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi. Selanjutnya dielusikan dengan menggunakan eluen *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5) yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik. Setelah gerakan larutan pengembang sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda yang terbentuk masing-masing diukur nilai R_f

nya. Noda-noda diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Isolat-isolat yang diperoleh dari hasil KLT preparatif, dilarutkan dengan aseton : air dan disentrifuge kemudian dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis merk Shimadzu. Masing-masing isolat sebanyak 2 mL dimasukkan dalam kuvet dan diamati spektrumnya pada bilangan gelombang 200-800 nm. Identifikasi dilanjutkan dengan penambahan pereaksi geser NaOH 2 M, AlCl₃ 5%, AlCl₃ 5%/HCl, NaOAc, NaOAc/H₃BO₃. Kemudian diamati pergeseran puncak serapannya. Tahapan kerja penggunaan pereaksi geser adalah sebagai berikut:

- Isolat yang dapat diamati pada panjang gelombang 200-800 nm, direkam dan dicatat spektrum yang dihasilkan.
- Isolat dari tahap 1 ditambah 3 tetes NaOH 2 M kemudian dikocok hingga homogen dan diamati spektrum yang dihasilkan. Sampel didiamkan selama 5 menit dan diamati spectrum yang dihasilkan.
- Isolat dari tahap 1 kemudian ditambah 6 tetes pereaksi AlCl₃ 5 % dalam metanol kemudian dicampur hingga homogen dan diamati spektrumnya. Sampel ditambah dengan 3 tetes HCl kemudian dicampur hingga homogen dan diamati spektrumnya.
- Isolat dari tahap 1 ditambah serbuk natrium asetat kurang lebih 250 mg. Campuran dikocok sampai homogen menggunakan fortex dan diamati lagi spektrumnya. Selanjutnya larutan ini ditambah asam borat kurang lebih 150 mg dikocok sampai homogen dan diamati spektrumnya.

Isolat hasil KLT preparatif yang diduga senyawa tanin diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer FTIR. 0,2 g pelet KBr ditambahkan dengan satu tetes isolat yang diduga senyawa tanin, dikeringkan kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR merk IR Buck M500 Scientific dengan panjang gelombang 4000-400 cm⁻¹.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai rendemen ekstrak tannin pekat sebesar 10,78% (b/b) dari sekitar 50 gram serbuk

daun belimbing wuluh. KLT merupakan metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fasa yaitu fasa diam dan fasa gerak. KLT analitik ini digunakan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang baik dalam pemisahan senyawa tanin. Eluen yang baik adalah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk

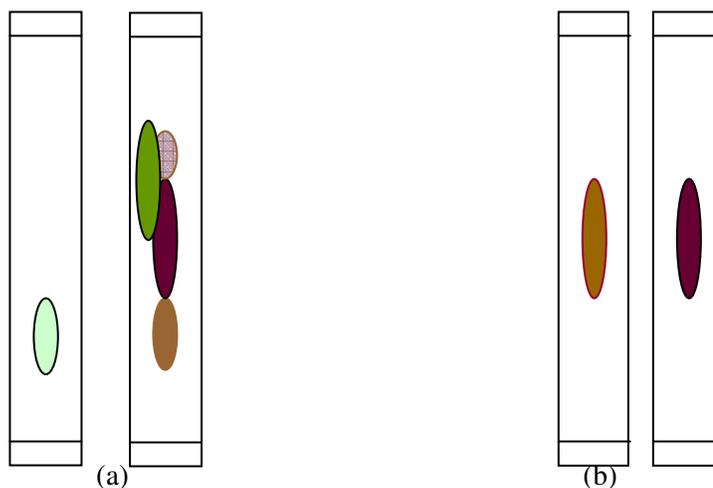
tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas (Harborne, 1987). Noda yang dihasilkan selanjutnya diamati di bawah sinar lampu UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Data noda yang terbentuk dari hasil pemisahan dengan kromatografi lapis tipis dengan beberapa eluen dapat dilihat dalam Tabel 1.

Tabel 1. Data penampakan noda fasa air hasil KLT analitik dengan beberapa eluen dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm

No	Eluen	Jumlah Noda	Keterangan
1	<i>n</i> -butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5)	3	Terpisah baik
2	etil asetat : kloroform : asam asetat 10 % (15:5:2)	2	Terpisah baik
3	asam asetat glasial : H ₂ O : HCl pekat (Forestal) (30:10:3)	1	Tak terpisah
4	metanol : Etil asetat (4:1)	-	Tak terpisah
5	etil asetat : metanol : asam asetat (6:14:1)	-	Tak terpisah
6	toluen : etil asetat (3:1)	-	Tak terpisah

Tabel 1 menunjukkan bahwa eluen campuran *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5) mampu memberikan pemisahan terbaik, hal ini dapat dilihat dengan adanya noda yang terpisah dengan baik dan jumlah noda paling banyak yaitu 3 noda. Karena dari komposisinya, eluen tersebut bersifat sangat polar sehingga bisa memisahkan senyawa tanin yang juga bersifat polar. Sedangkan, untuk kelima eluen lainnya

belum bisa memisahkan senyawa tanin dari daun belimbing wuluh dengan baik karena kepolaran eluen masih lebih rendah dari kepolaran senyawa tanin. Dengan demikian, eluen BAA digunakan dalam pemisahan senyawa tanin dengan KLT preparatif. Adapun gambar plat hasil KLT analitik eluen terbaik *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5) disajikan pada Gambar 1 dan Tabel 2.



Gambar 1. a. Ilustrasi noda hasil KLTA ekstrak daun belimbing wuluh dengan eluen BAA (4:1:5) dengan sinar UV 254 dan 366 nm,
b. Ilustrasi noda hasil KLTA ekstrak daun belimbing wuluh dengan eluen BAA (4:1:5) dengan sinar UV 254 dan 366 nm.

Tabel 2. Harga R_f dan warna noda hasil KLTA eluen terbaik *n*-butanol : asam asetat : air (BAA) (4:1:5) dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm

Noda	Nilai R_f	Warna Noda	
		254 nm	366 nm
1.	0,53	Coklat kehijauan	Coklat kehijauan
2.	0,61	Hijau	Ungu kemerahan
3.	0,68	-	Ungu kemerahan

Kepolaran fasa diam dan fasa gerak hampir sama, tetapi masih lebih polar fasa gerak sehingga senyawa tanin yang dipisahkan terangkat mengikuti aliran eluen, karena senyawa tanin bersifat polar. Dari ketiga noda yang ada maka noda yang kedua adalah noda yang diduga senyawa tanin, yang memiliki harga R_f sebesar 0,61 dan warna noda saat disinari dengan lampu UV 366 berwarna lembayung. Hal ini diperkuat oleh Harborne (1987) bahwa tanin dapat dideteksi dengan sinar UV pendek berupa noda yang berwarna

lembayung, selain itu didukung dengan R_f dari ekstrak tanaman mimosa (memiliki kadar tanin yang tinggi) yang dielusi dengan eluen yang sama dengan harga R_f sebesar 0,62.

Pemisahan dengan KLT analitik menghasilkan harga R_f dari noda pertama sebesar 0,53 yang diduga senyawa antosianidin (Olivina, 2005). Noda kedua dan ketiga dengan harga R_f 0,61 dan 0,68 diduga senyawa tanin terkonkonsentrasi. Senyawa tanin diduga mempunyai nilai R_f 0,61, hal ini didukung dari pengukuran standar tanin dari tanaman mimosa yang

memiliki kadar tanin yang besar dengan harga R_f sebesar 0,62. Noda-noda hasil KLT preparatif yang mendekati harga R_f tanin dari tanaman mimosa dan warna yang menunjukkan tanin dikerok dan dilarutkan dalam pelarut aseton:air (7:3), kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan FTIR

Berdasarkan hasil identifikasi senyawa tanin dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan panjang gelombang maksimum dari 2 puncak yang diperoleh yang diduga terdapat senyawa tanin sebesar 331 nm. Hal ini didukung dengan hasil identifikasi senyawa tanin dari tanaman mimosa yang sebagai standar dari tanin karena memiliki kadar tanin yang besar

sama-sama memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 318 nm.

Senyawa tanin merupakan senyawa yang termasuk golongan senyawa flavonoid, karena dilihat dari strukturnya yang memiliki 2 cincin aromatik yang diikat oleh tiga atom karbon. Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Penentuan spektrum menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser NaOH 2 M, $AlCl_3$ 5%, $AlCl_3$ 5%/HCl, NaOAc, NaOAc/ H_3BO_3 dapat dilihat dalam Tabel 3.

Tabel 3. Data spektrum UV-Vis dari isolat sebelum dan sesudah penambahan pereaksi geser

Pereaksi	Panjang gelombang			Pergeseran panjang gelombang			Dugaan distribusi		
	Isolat			Isolat			Isolat		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
----	331,0	331,0	-	-	-	-	-	-	-
NaOH	341,5	333,5	-	+10,5	+2,5	-	4'-OH	4'-OH	-
NaOH 5 menit	341,5	333,0	-	+10,5	+2,0	-	4'-OH	4'-OH	-
$AlCl_3$ 5 %	328,0	331,0	-	-3,0	tetap	-	Mungkin o-di OH pada cincin A	Mungkin o-di OH pada cincin A	-
$AlCl_3$ 5 % + HCl	331,0	333,0	-	tetap	+2,0	-	Mungkin o-di OH pada cincin A	Mungkin o-di OH pada cincin A	-
NaOAc	329,0	329,0	-	-2,0	-2,0	-	Gugus yang peka terhadap basa, misal 6,7 atau 7,8 atau 3,4'-diOH	Gugus yang peka terhadap basa, misal 6,7 atau 7,8 atau 3,4'-diOH	-
NaOAc + H_3BO_3	330,0	331,5	-	-1,0	+0,5	-	o-diOH pada cincin A (6,7) atau (7,8)	o-diOH pada cincin A (6,7) atau (7,8)	-

Sumber: Markham, 1988

Dari data spektrum pada Tabel 3 didapatkan senyawa tanin yang mungkin dari hasil KLT preparatif di bawah sinar UV 254 dan 366 nm adalah isolat 2. Hal ini dikarenakan isolat 2 memiliki panjang gelombang maksimum yang hampir sama dengan tanin standar.

Identifikasi dengan spektrofotometri inframerah (FTIR) hasil pemisahan KLTP menunjukkan bahwa isolat 2 mengandung gugus fungsi seperti rentangan asimetri O-H pada bilangan gelombang $3372,4\text{ cm}^{-1}$, sebagai akibat dari vibrasi ikatan hidrogen intramolekul. Bilangan gelombang $2071,8\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan puncak serapan C-H deformasi keluar bidang. Pada spektrum ini tidak terlihat adanya pita serapan karbonil di daerah 1700 cm^{-1} , tetapi terdapat pita serapan agak melebar di bilangan gelombang $1625,8\text{ cm}^{-1}$ dimungkinkan merupakan pita gabungan dari uluran C=O dan serapan ikatan rangkap C=C aromatik. Hal ini mungkin dikarenakan kuatnya efek resonansi gugus karbonil dengan cincin aromatik. Dugaan senyawa tanin diperkuat dengan adanya cincin aromatik yang tersubstitusi pada posisi orto yang ditunjukkan dengan puncak serapan pada bilangan gelombang 782,5. Puncak-puncak spesifik tersebut merupakan puncak spesifik dari senyawa tanin, sehingga memperkuat dugaan bahwa dalam isolat 2 hasil pemisahan senyawa tanin dengan KLTP mengandung senyawa tanin. Jenis senyawa tanin yang diperoleh dari hasil pemisahan ekstrak (isolat 2) daun belimbing wuluh dengan kromatografi lapis tipis diduga adalah flavan-3,6,7,4',5'-pentaol atau flavan-3,7,8,4',5'-pentaol.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Eluen yang terbaik untuk pemisahan senyawa tanin dari daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) analitik adalah eluen *n*-butanol : asam asetat : air dengan perbandingan (4:1:5).

Jenis senyawa tanin yang diperoleh dari hasil pemisahan ekstrak daun belimbing wuluh dengan kromatografi lapis tipis diduga adalah

flavan-3,6,7,4',5'-pentaol atau flavan-3,7,8,4',5'-pentaol.

Saran

Perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap isolat hasil pemisahan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Direktorat Pendidikan Tinggi Islam, Kementerian Agama yang telah memberikan bantuan dana penelitian dan semua pihak yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Faharani, G. B., 2009, *Uji Aktifitas Antibakteri Daun Belimbing Wuluh Terhadap Bakteri Streptococcus Aureus dan Achercia Coli secara Bioautografi*, FMIPA UI, Jakarta
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, ITB, Bandung
- Hayati, E. K., Jannah, A., dan Fasya, A. G., 2009, *Aktivitas Antibakteri Komponen Tanin Ekstrak Daun Blimbing Wuluh (Averrhoa Billimbi L) Sebagai Pengawet Alami, Penelitian Kompetitif Depag. Malang*, UIN, Malang
- Hayati E. K., Jannah A., dan Mukhlisoh W., 2010, *Pengaruh Ekstrak Tunggal dan Gabungan Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi Linn) Terhadap Efektivitas Antibakteri Secara In Vitro*, Kimia, UIN Malang, Malang
- Horvart, 1981, *Tannins: Definition*. 2001 http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxic_agents/tannin/definition.html. animal science webmaster, Cornert University
- Lidyawati, *et al.*, 2006, *Karakterisasi Simplisia dan Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.)*. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id>, 2 Juni 2009
- Makkar, H. P. S. dan Becker, K., 1998, *Do Tannins In Leaves Of Trees And Shrubs From African And Himalayan Regions*

- Differ In Level And Acactivity,
Argoforesy Systems, h. 59-68
- Markham, R. K., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, ITB, Bandung
- Nuraini, F., 2002, Isolasi Dan Identifikasi Tannin Dari Daun Gamal (*Gliricidia sepium* (Jackquin) kunth ex walp.), *Skripsi*, Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Malang
- Olivina, P., *et al.*, 2005, Telaah Fitokimia Dan Aktivitas Penghambatan Xantin Oksidase Ekstrak Kulit Batang Salam (*Syzygium polyanthum* (Weight) Walp.), *Skripsi*, Jurusan Farmasi, ITB, Bandung
- Ummah Mk., Ekstraksi Dan Pengujian Aktivitas Antibakteri Senyawa Tanin Pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) (Kajian Variasi Pelarut), *Skripsi*, Kimia UIN Malang, Malang
- Yuliani, 2008, *Kadar Tanin Dan Querestin Tiga Tipe daun Jambu Biji (Psidium Guajava)*, Balai Penelitian Tanaman Rempah Dan Obat, <http://www.balitra.go.id>, 27 Maret 2009