

## Kajian aktivitas anti bakteri ekstrak etanol dan fraksi daun singawalang (*Petiveria alliacea*) terhadap bakteri resisten

### Antibacterial activity of ethanolic extract and fraction of leaves of singawalang (*Petiveria alliacea*) against resistant bacteria

Yani Mulyani\*, Elin Yulinah Sukandar dan I Ketut Adnyana

Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa No. 10 Bandung

---

#### Abstrak

*Petiveria alliacea* yang tumbuh di Indonesia telah digunakan sebagai analgetik, antiinflamasi dan sebagai salah satu tanaman obat yang digunakan untuk menurunkan panas karena infeksi. Ramuan obat tradisional yang mengandung *Petiveria alliacea* telah digunakan di Karibia, Amerika Latin, Afrika Barat dan daerah lainnya selama ratusan tahun untuk mengobati rasa sakit, flu, inflamasi, tumor, infeksi bakteri, jamur, hiperlipidemia, diabetes dan penyakit lainnya. *Petiveria alliacea* tumbuh sebagai tanaman liar dan belum ada pembudidayaannya hingga perlu untuk pengkajian akan khasiat dan manfaat sehingga tanaman ini bisa dibudidayakan untuk menghindari kepunahan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas singawalang yang tumbuh di Indonesia terhadap bakteri resisten. Pengujian dilakukan dengan menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bakterisidal minimum (KBM) dari ekstrak dan fraksi dengan metode *broth microdilution* terhadap MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), MRCNS (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus*), dan VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococcus*). Studi lanjut dilakukan dengan melakukan kajian tipe kerja dengan melihat kurva pertumbuhan dan mengamati perubahan dinding sel dengan pemindai mikroskop electron (SEM) pada MRCNS (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus*). Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan semua fraksi menunjukkan aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri resisten, fraksi heksan bersifat bakteristatik sampai konsentrasi 8 KHM dan mengubah morfologi dinding sel dari MRCNS.

**Kata kunci :** Singawalang, Antibakteria, *Broth Microdilution*, kurva pertumbuha, SEM

#### Abstract

One of the plants that grow in Indonesia, and still does not use widely is singawalang (*Petiveria alliacea*) from Phytolaceae family. Traditional herbal medicine preparations contained of *Petiveria alliacea* in the Caribbean, Latin America, West Africa and other regions for hundreds years has been used to treat pain, colds, inflammation, tumor, bacterial and fungal infection, hyperlipidemia, diabetes and other diseases. This study aims to determine the antibacterial activity of singawalang growth in Indonesia against resistant bacteria to antibiotics. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration(MBC) were determined by microdilution broth method and type of antibacterial action were determined by observing the profile of bacterial growth curve. Ethanol extract of dried leaves showed activity against bacteria i.e. MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), MRCNS (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci*), VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococcus*). Further studies conducted by reviewing the type of

work by looking at the growth curve and the observed changes in cell walls by scanning electron microscopy (SEM) at MRCNS (Methicillin-Resistant Staphylococcus coagulase-Negative). The results showed that ethanol extracts and all fractions showed good antibacterial activity against resistant bacteria, are bacteriostatic hexane fraction until the concentration of 8 MIC and change the morphology of the cell wall of MRCNS.

**Key words:** Singawalang, Antibacteria, Broth Microdilution, bacterial growth curve, SEM

## Pendahuluan

Salah satu masalah kesehatan masyarakat yang paling serius pada dekade terakhir adalah adanya pengembangan resistensi mikroba terhadap antibiotik dan antimikroba sintetik. Dengan demikian, penemuan antibakteri baru merupakan kebutuhan yang sangat mendesak (Amer, *et al.*, 2008). Penyakit infeksi masih merupakan penyumbang tertinggi angka kesakitan dan angka kematian di negara berkembang termasuk di Indonesia. Sesuai kebijakan kesehatan dari Departemen Kesehatan, arah kebijakan umum riset dengan bidang fokus pembangunan kesehatan dan obat tahun 2010—2014 adalah peningkatan ketersediaan obat dan agenda Riset Nasional memfokuskan pada pencarian senyawa baru yang berkhasiat sebagai obat (Departemen Riset dan Teknologi, 2010). Sementara itu, informasi penggunaan tumbuhan dalam pengobatan tradisional merupakan salah satu pendekatan untuk menemukan obat baru (Fabricant, Farnsworth, 2001), sehingga pemanfaatan ketersediaan obat dapat dipenuhi dari tanaman yang tumbuh di Indonesia. Pengembangan antimikroba dari tumbuhan mempunyai prospek yang baik untuk mengatasi resistensi mikroba oleh karena itu pada penelitian pendahuluan dilakukan seleksi tumbuhan yang secara tradisional digunakan untuk obat kulit, luka dan gatal dan dicari yang aktif terhadap bakteri yang resisten, hasilnya daun singawalang unggul dibandingkan dengan yang lain.

Singawalang (*Petiveria alliacea*) yang termasuk ke dalam famili Phytolaceae di Indonesia belum banyak dimanfaatkan sedangkan di Karibia, Amerika Latin, Afrika Barat dan daerah lainnya sudah ratusan tahun digunakan sebagai pereda rasa sakit, flu, antiinflamasi, antitumor, antibakteri, antijamur, antihiperlipidemia, antidiabetes dan untuk menangani penyakit lainnya (Tropical Plant Database—Anamu, 2010). *Petiveria Alliacea* secara tradisional di Indonesia digunakan sebagai

analgetik, antiinflamasi dan sebagai tanaman obat untuk batuk berdarah.

Pengujian sebelumnya pada *Petiveria alliacea* yang pernah dilakukan menunjukkan aktivitas antibakteri dan anti fungi yang baik. Senyawa yang terkandung dalam *Petiveria alliacea* yang diduga sebagai komponen utama yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri dan anti fungi adalah kumpulan senyawa thiosulfinates dan sulfines (Kim, *et al.*, 2006; Benevides, *et al.*, 2001). Namun pengujian kepada bakteri yang resisten belum pernah dilaporkan dalam laporan ilmiah sejenis. Tujuan penelitian ini menentukan aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi singawalang terhadap bakteri resisten.

## Metodologi

### Pengumpulan tanaman uji, determinasi, dan ekstraksi dan fraksinasi

Tanaman singawalang diperoleh dari daerah Cilendek, Bogor berdasarkan kajian survey etnobotani di salah satu kampung di daerah Bogor. Diambil bagian daun pada tanaman *Petiveria alliacea* yang memiliki ketinggian antara 80–120 cm, dimana daun dipetik dari tingkat pertama hingga lima tingkat ke bawah setelah daun utama bagian atas. Tanaman di determinasi pada departemen Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB.

Pengolahan daun meliputi sortasi basah, pencucian, perajangan hingga menjadi bagian kecil, pengeringan, dan penggilingan menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 200 mg, diekstraksi dengan 1000 mL etanol 96 % menggunakan alat maserasi selama 24 jam kemudian disaring. Penyaringan menggunakan kertas saring Whatmann No. 42 (125mm). Residu dimaserasi kembali dua kali dengan etanol 96 %. Filtrat yang diperoleh disatukan kemudian dipekatkan dengan rotary vacuum evaporator (Buchi, Switzerland), pada suhu 50–60°C Ekstrak dipekatkan kembali dengan penangas air bersuhu 50–60°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental disimpan di dalam lemari es yang dijaga suhu antara 5–10°C.

Fraksinasi dilakukan terhadap ekstrak etanol, dengan menggunakan 2 jenis pelarut, yaitu *n*-heksan

dan etil asetat. Ekstrak etanol ditempatkan dalam corong pisah, ke dalamnya ditambahkan pelarut *n*-heksan dengan perbandingan 1 : 1, kemudian dikocok secara perlahan hingga tercampur, kemudian dibiarkan hingga tepat memisah menjadi 2 fase yang terdiri dari fase *n*-heksan dan fase air. Fase *n*-heksan dipisahkan dan fase air difraksinasi kembali hingga tiga kali. Fase *n*-heksan yang telah terkumpul dipekatkan menggunakan alat *rotary evaporator* dan penangas air. Fase air difraksinasi kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1 : 1, proses fraksinasi ini dilakukan tiga kali hingga diperoleh fase etil asetat dan fase air, yang masing-masing dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* dan penangas air. Dari fraksinasi, diperoleh 3 fraksi, yaitu fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air.

#### Mikroba Uji

MRCNS (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus*) 24, MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) 25, dan VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococcus*) 8-5, diperoleh dari laboratorium Farmakologi-Toksikologi Sekolah Farmasi, ITB.

#### Uji Aktivitas Antimikroba Pembuatan media

*Muehler Hilton broth* sebanyak 23 g dilarutkan dalam 1 L aquadest, dan *Muehler Hilton agar* sebanyak 38 gram dalam 1 L aquadest dan dipanaskan sampai terlarut sempurna. Sebelum digunakan, semua media disterilisasi terlebih dulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit.

#### Pembuatan suspensi mikroba

Mikroba disuspensikan ke dalam media cair dan diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C. Suspensi dikocok dan diatur kekeruhannya hingga setara dengan standar kekeruhan 0,5 McF. Standar kekeruhan 0,5 McF sama dengan mengandung bakteri sejumlah  $10^8$  CFU/mL, menghasilkan absorbansi pada panjang gelombang 625nm sebesar 0,08 - 0,10 (NCCLS, 2003).

#### Penentuan KHM dan KBM

Sebanyak 100  $\mu$ L *muebler Hilton broth* dimasukkan dalam pelat mikro pada kolom pertama (sebagai kontrol negatif). Suspensi mikroba sebanyak 5  $\mu$ L ditambahkan ke dalam 10 mL *muebler Hilton broth* kemudian diaduk dengan alat vortex. Sebanyak 100  $\mu$ L campuran tersebut dimasukkan dalam pelat mikro pada kolom kedua sampai kedua belas. Pada kolom kedua belas, ditambahkan 100  $\mu$ L larutan antibiotik / ekstrak kemudian dihomogenkan. Dari kolom kedua belas, diambil 100  $\mu$ L kemudian dipindahkan ke kolom kesebelas. Pengenceran terus dilakukan sampai pada kolom ketiga yang akan memiliki konsentrasi terkecil. Pelat diinkubasi pada

suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati bagian yang jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba).

Nilai KBM ditentukan setelah larutan uji tersebut ditumbuhkan kembali pada medium *muebler Hilton* agar. Sebanyak 5  $\mu$ L alikot dari setiap bagian yang jernih dipindahkan dalam nutrient agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati. Konsentrasi terkecil di mana tidak terlihat pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KHM. Konsentrasi terendah di mana tidak terlihat adanya pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KBM. (NCCLS, 2003).

#### Penentuan *killing curve*

Penentuan *killing curve* dilakukan dengan menyiapkan awal mikrobiologi dengan konsentrasi sekitar  $10^6$  CFU/mL. Pada inokulum, ditambahkan antimikroba dengan konsentrasi akhir 1, 2, 4, dan 8 MIC kemudian diinkubasi pada 37°C. Pada 0, 1, 2, 3, 5 dan 24 jam setelah inkubasi, 100  $\mu$ L alikot dari tiap konsentrasi antimikroba diambil dan diencerkan secara bertahap kemudian diinokulasikan pada media agar. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada 37°C, koloni mikroba pada *muebler Hilton* agar dihitung dan dibuat grafik log CFU/mL terhadap waktu. Semua dilakukan sebanyak dua hingga tiga kali percobaan. (Sambatakou, et. al., 1998; Carmen, et. al. 1994).

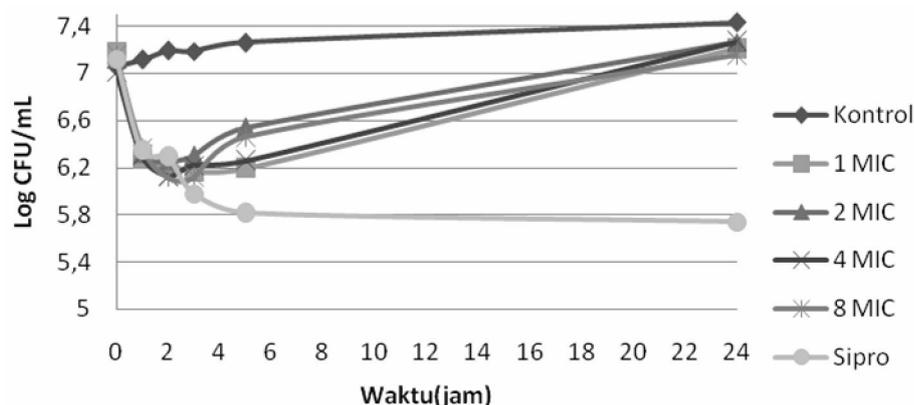
#### Pengamatan morfologi sel

Suspensi bakteri yang berumur 24 jam untuk MRCNS, ditambahkan fraksi *n*-heksan dengan konsentrasi 0 dan 8x KHM. Larutan uji diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit dan dipisahkan supernatan dari endapan sel.

Endapan sel atau pellet direndam dengan glutaraldehid 2% selama semalam, lalu ditambahkan chocodylate buffer, dan direndam selama 20 menit. Larutan uji di sentrifus dan supernatant dipisahkan. Pellet ditambah osmium tetraoksida 1% dan direndam selama 1 jam, selanjutnya dikeringkan berturut turut dengan alkohol 70%, 80%, 95% dan alkohol absolut masing masing selama 20 menit. Pellet disuspensikan dengan dengan penambahan butanol, kemudian suspensi diletakkan diatas cover slip yang telah mengering di cover slip kemudian dilapisi dengan emas melalui proses vakum selama 20 menit dan diamati dengan *Scanning electron Microscopy* (JEOL JSM-6360LA).

#### Hasil dan Pembahasan

Pada awal penelitian, tumbuhan yang digunakan dideterminasi untuk mengetahui kebenaran identitas botani tumbuhan tersebut. Hasil determinasi tumbuhan menunjukkan bahwa jenis tumbuhan adalah *Petiveria alliaceae*.



Gambar 1 : Kurva aktivitas terhadap waktu bakteri MRCNS, dengan pemberian ekstrak etanol daun singawalang, pada berbagai konsentrasi dan pembandingan siprofloksasin

Keterangan :

1MIC=16mcg/mL; 2MIC=32 mcg/mL; 4MIC=64 mcg/mL; 8MIC=128 mcg/mL;

Sipro=Siprofloksasin 2 mcg/mL

Tabel I. Hasil penentuan nilai KHM dan KBM dari ekstrak etanol singawalang pada berbagai bakteri resisten

Mikroba	S (mcg/mL)		A (mcg/mL)		ES(mcg/mL)	
	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM
MRSA 25	1	16	256	-	16	-
MRCNS 24	2	6	64	512	16	256
VRE 8-5	32	-	128	-	256	-

Keterangan :

KHM= Kadar Hambat minimal; KBM = Kadar Bunuh Minimal; S = siprofloksasin; A = Ampisilin; ES = Ekstrak Daun Singawalang; MRCNS = *Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus*; MRSA = *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*; VRE = *Vancomycin-Resistant Enterococcus*; - = nilai > 512 mcg/mL

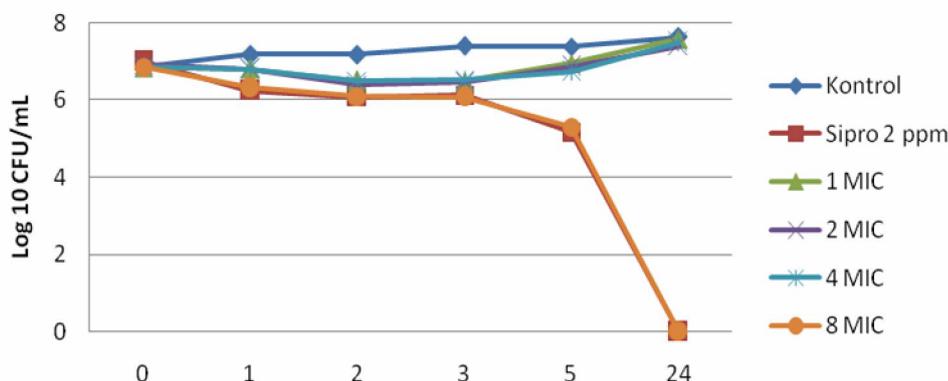
Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan etanol. Etanol merupakan pelarut universal yang dapat menarik sebagian besar senyawa polar, sebagian kecil senyawa semi polar, dan sebagian kecil senyawa non-polar sehingga diharapkan dapat menarik berbagai senyawa dalam simplisia. Dari hasil ekstraksi, diperoleh rendemen ekstrak 10,28%.

Penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat dinyatakan dengan KHM dan KBM. Nilai KHM dan KBM senyawa antibakteri dari setiap ekstrak berbedabeda bergantung dari jenis bakteri dan senyawa antibakteri yang terkandung didalamnya. Nilai KHM dan KBM dengan

metode *broth microdilution* untuk ekstrak etanol dan fraksi daun Singawalang berkisar antara 16-512  $\mu\text{g/mL}$  (Tabel I dan II). Aktivitas antibakteri dari suatu ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas yang kuat dengan nilai MIC kurang dari 512  $\mu\text{g/mL}$ , sehingga dilanjutkan ke fraksinasi (Holetz, *et al.*, 2002).

Penelitian lebih lanjut dilakukan pada ekstrak etanol daun terhadap MRCNS dikarenakan mempunyai nilai KHM dan KBM terendah jika dibandingkan dengan yang lain.

Dari hasil pengujian KHM dan KBM, dilanjutkan penentuan kurva aktivitas terhadap waktu dari ekstrak etanol dan fraksi N-heksan terhadap MRCNS (Gambar 1 dan 2).



Gambar 2 : Kurva aktivitas terhadap waktu bakteri MRCNS, dengan pemberian fraksi n-heksana, pada berbagai konsentrasi dan pembandingan siprofloksasin

Keterangan : 1 MIC = 256 mcg/mL, 2 MIC = 512 mcg/mL, 4 MIC = 1024 mcg/mL, 8 MIC = 2056 mcg/mL, Sipro = Siprofloksasin 2 mcg/mL

Tabel II. Hasil penentuan nilai KHM dan KBM dari fraksi etanol singawalang pada berbagai bakteri resisten

Mikroba	S (µg/mL)		F.H(µg/mL)		F.EA(µg/mL)		F.A(µg/mL)	
	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM
<b>MRCNS 24</b>	1	2	256	-	512	-	512	-
<b>VRE 8-5</b>	8	32	256	-	512	-	512	-
<b>MRSA 25</b>	256	-	512	-	512	-	512	-

Keterangan :

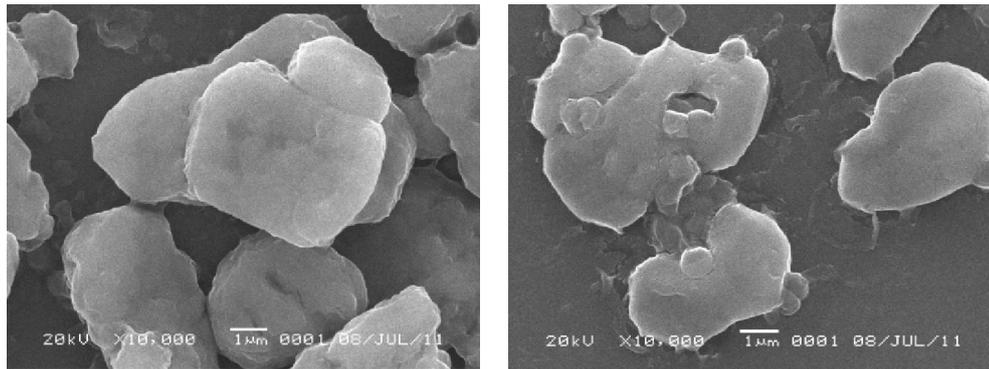
KHM= Kadar Hambat minimal; KBM = Kadar Bunuh Minimal; FH = Fraksi Heksan; FEA= Fraksi Etil Asetat; FA = Fraksi Air; S = siprofloksasin; A = Ampisilin; ES = Ekstrak Singawalang; MRCNS = *Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus*; MRSA = *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* ; VRE = *Vancomycin-Resistant Enterococcus* ; - = nilai > 512 mcg/mL

Gambar 1 kurva aktivitas terhadap waktu untuk bakteri MRCNS menandakan aktivitas antibakteri bakteriosatik.

Dimana pertumbuhan bakteri dihambat pada jam ke 1 , 2 dan 3, kemudian bakteri tumbuh kembali di jam ke 5 hingga jam ke 24. Hal ini menandakan khasiat antibakteri dari ekstrak sudah kurang sehingga perlu penambahan lagi senyawa ekstraknya. Untuk antibiotika pembandingan siprofloksasin, memberikan aktivitas antibakteri bakterisid, dimana pertumbuhan bakteri terus menurun dan stabil hingga jam ke 24.

Pada gambar 2 kurva aktivitas terhadap waktu untuk bakteri MRCNS menandakan aktivitas antibakteri bakteriosatik hingga konsentrasi fraksi n-heksana 2,048mg/mL. Aktivitas antibakteri pada konsentrasi 4,096mg/mL menandakan sifat bakterisid menyerupai aktivitas antibiotika pembandingan siprofloksasin.

Hasil penelitian menunjukkan morfologi sel *MRCNS* mengalami perubahan setelah pemberian fraksi n-heksan dari ekstrak etanol daun jika dibandingkan sel normal. *MRCNS* dalam keadaan normal memiliki permukaan yang halus dan licin seperti terlihat pada gambar



Gambar 3. SEM micrograph *MRCNS* (a) kontrol dan (b) setelah kontak dengan 8 MIC (2.056mg/mL) fraksi n-heksana

1 (a), sedangkan dengan adanya pemberian fraksi heksana konsentrasi 8 x KHM menjadikan permukaan sel yang kasar (terdapat tonjolan-tonjolan akibat tidak rata dinding sel) dan sel menjadi mengkerut seperti terlihat pada gambar 1 (b).

Menurut Miksusanti, (2008) terbentuknya tonjolan-tonjolan kecil pada sel bakteri disebabkan ketidakmampuan peptidoglikan sel yang rusak oleh senyawa antibakteri menahan tekanan intraselular yang tinggi, sehingga sitoplasma keluar dan tonjolan ini biasanya muncul pada daerah yang dilemahkan oleh senyawa antibakteri. Pada konsentrasi ini (2 x KHM) bakteri telah mengalami kerusakan pada dinding dan membran sel. Secara keseluruhan diduga fraksi heksana dari ekstrak etanol daun

singawalang dapat merusak dinding sel dan mempengaruhi permeabilitas membran sel dikarenakan adanya senyawa aktif antibakteri dalam ekstrak etanol daun singawalang.

### Kesimpulan

Dari pengujian aktivitas antimikroba dengan metode *broth microdilution*, ekstrak etanol dan fraksi memiliki aktivitas kuat terhadap bakteri MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), MRCNS (*Methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococcus*), dan VRE (*Vancomycin-resistant Enterococcus*). Hasil penentuan kurva aktivitas terhadap waktu menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi n heksan bersifat bakteriostatik terhadap bakteri resistan MRCNS

### Daftar Pustaka

- Amer, F.A., El-Behedy, E.M., and Mohtady, H.A., 2008. New Target for Antibacterial Agents. *Biotechnology and molecular Biology Reviews*; 3(3), 46-57
- Benevides, P.J.C., Young, M.C.M., Giesbrecht, A.M., Roque, N.F., and Bolzani, V.S., , 2001, Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochemistry* 57; 743-747
- Betriu C, Gomez M, Sanchez A, Cruceyra A, Romero J, and Picazo JJ . 1994. Antibiotic Resistance and Penicillin Tolerance in Clinical Isolates of Group B Streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; **38(9)**: 2183.
- Departemen Kesehatan RI. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. 2000. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional; Jakarta
- Departemen Riset dan Teknologi. 2010. Agenda Riset Nasional 2010-2014. Lampiran keputusan Menteri Riset dan Teknologi.

- Fabricant DS, Farnsworth NR. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*; Mar:109(Suppl 1), 69–75
- Holetz, F.B, Pessini, G.L, Sanches, N.R, Cortez, D.A, Nakamura, C.V, and Filho, B.P., 2002, Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 97: 000-000
- Miksusanti., Jennie, B. S. L., Panco, B. dan Trimulyadi, G., 2008, Kerusakan Dinding Sel *Escherichia coli* K1.1 oleh Minyak Atsiri Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*), *Berita Biologi* 9(1):1-8
- Kim, S., Kubec, R., Musah, R.A., 2006; Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. *J Ethnopharm*104: 188–192
- NCCLS. 2003. *Methods for Dillution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard; Sixth Edition*
- Sambatakou, H., Giamarellos, B.E.J., Grecka, P., Chryssouli, Z., and Giamarellou, H., 1998. In-vitro activity and killing effect of quinupristin/dalfopristin (RP59500) on nosocomial *Staphylococcus aureus* and interactions with rifampicin and ciprofloxacin against methicillin-resistant isolates. *J Antimicrob Chemother*; 41:349-55
- Tropical Plant Database–Anamu (*Petiveria alliacea*), Rain tree. <http://www.rain-tree.com/anamu.htm>, Accessed on 12 January 2010

---

\*Korespondensi: Yani Mulyani  
Sekolah Farmasi ,Institut Teknologi Bandung,  
Jl. Ganesa No. 10 Bandung  
Email: yani\_m211178@yahoo.co.id