

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA TERPENOID YANG AKTIF ANTIBAKTERI PADA HERBA MENIRAN (*Phyllanthus niruri* Linn)

I W. G. Gunawan, I G. A. Gede Bawa, dan N. L. Sutrisnayanti

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa terpenoid antibakteri dari herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) dengan metode Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa. Ekstraksi senyawa dilakukan dengan dua cara yaitu maserasi dengan pelarut metanol dan sokletasi dengan pelarut *n*-heksanaa.

Hasil uji fitokimia menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard pada ekstrak *n*-heksanaa hasil maserasi dan ekstrak *n*-heksanaa hasil sokletasi menunjukkan bahwa kedua ekstrak tersebut positif mengandung senyawa terpenoid. Hasil uji aktivitas ekstrak *n*-heksanaa terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC[®] 25292 dan *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25293 menunjukkan fraksi *n*-heksanaa hasil sokletasi memberikan daya hambat yang lebih baik. Daya hambat fraksi *n*-heksanaa hasil maserasi adalah 1 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* dan 0,5 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, sedangkan daya hambat fraksi *n*-heksanaa hasil sokletasi yaitu 10 mm terhadap bakteri *Escherichia coli* dan 12 mm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Ekstrak *n*-heksanaa hasil sokletasi dimurnikan dengan menggunakan kromatografi kolom dan diidentifikasi dengan Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa. Data Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa, menunjukkan kemungkinan ekstrak *n*-heksanaa hasil sokletasi mengandung dua buah senyawa yaitu phytadiene [M⁺] 278 dan senyawa 1,2-seco-cladiellan m/z 335 [M⁺ - H].

Kata kunci : *Phyllanthus niruri* Linn, terpenoid, aktif antibakteri

ABSTRACT

Isolation and identification of terpenoid, antibacterial compounds meniran herb (*Phyllanthus niruri* Linn) by Gas Chromatography – Mass Spectroscopy were carried out. Two kinds of extraction, i.e. maseration using methanol and the sochlet using *n*-hexane were employed.

The extract obtained were contains terpenoids basedon fitochemical test of Liberman-Burchard *n*-hexane extract was tested for antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC[®] 25292 and *Staphylococcus aureus* ATCC[®] 25293. In this study we obtained that *n*-hexane extract by sochlet extraction showed greater activity compared to the extract by maseration with methanol, as indiated by disc diameter of inhibition zone. Diametric inhibition zone for these two extract are 1 mm for *Escherichia coli* and 0,5 mm for *Staphylococcus aureus*, for methanol extract, and where are 10 mm for *Escherichia coli* and 12 mm for *Staphylococcus aureus* for *n*-hexane extract.

The *n*-hexane extract was then purified using column chromatography. The pure extract was analyzed using Gas Chromatography - Mass Spectroscopy. Gas Chromatography - Mass Spectroscopy data indicated that the extract contains two compounds, i.e. *phytadiene* [M⁺] 278 and 1,2 *seco-cladiellan* m/z 335 [M⁺ - H].

Keyword : *Phyllanthus niruri* Linn, terpenoid, active againts bacteria

PENDAHULUAN

Perkembangan penggunaan obat-obatan tradisional khususnya dari tumbuh-tumbuhan untuk membantu meningkatkan derajat kesehatan masyarakat sudah cukup meluas. Salah satu jenis tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat adalah meniran (Oswald, 1995). Meniran adalah herba yang berasal dari genus *Phyllanthus* dengan nama ilmiah *Phyllanthus niruri* Linn (Heyne, 1987). Herba ini secara tradisional dapat digunakan sebagai obat radang ginjal, radang selaput lendir mata, virus hepatitis, peluruh dahak, peluruh haid, ayan, nyeri gigi, sakit kuning, sariawan, antibakteri, kanker, dan infeksi saluran kencing (Anonim, 2005; Mangan, 2003).

Herba meniran mengandung metabolit sekunder flavonoid, terpenoid, alkaloid dan steroid (Kardinan dan Kusuma, 2004). Beberapa hasil penelitian menunjukkan senyawa terpenoid memiliki aktivitas sebagai antibakteri yaitu monoterpenoid linalool, diterpenoid (-) *hardwicklic acid*, *phytol*, triterpenoid saponin dan triterpenoid glikosida (Grayson, 2000; Bigham *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2006; Anonim, 2007; Anonim, 2007)

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) mengandung senyawa terpenoid antibakteri.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian herba meniran segar (*Phyllanthus niruri* Linn) yang diperoleh dari Kelurahan Kerobokan Kelod, Kecamatan Kuta Utara, Kabupaten Badung, Propinsi Bali. Herba meniran dikeringkan kemudian diblender sampai berbentuk serbuk.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian terdiri dari metanol (p.a), asam asetat anhidrida (p.a), H₂SO₄ pekat, kloroform (p.a), *n*-heksana (p.a), benzena (p.a), KOH 10%, kalsium klorida anhidrat, HCl 4 M, kalium bromida, silika GF₂₅₄, silika G₆₀, akuades.

Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : neraca analitik, blender, labu erlenmeyer, penguap vakum, pipet ukur, labu ukur, corong pisah, botol reagen, kertas saring, seperangkat alat gelas, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, kromatografi gas-spektroskopi massa, refluks, sokhlet dan lampu ultra violet 254 nm dan 366 nm.

Cara Kerja

Ekstraksi

Ekstraksi senyawa terpenoid dilakukan dengan dua cara yaitu :

1. Sokletasi

Seberat 1000 g serbuk kering herba meniran disokletasi dengan 5 L pelarut *n* – heksana. Ekstrak *n*-heksana dipekatkan lalu disabunkan dalam 50 mL KOH 10%. Ekstrak *n*-heksana dikentalkan lalu diuji fitokimia dan uji aktivitas antibakteri.

2. Maserasi

Seberat 1000 g serbuk kering herba meniran dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol dipekatkan lalu dihidrolisis dalam 100 mL HCl 4 M. Hasil hidrolisis diekstraksi dengan 5 x 50 mL *n* – heksana. Ekstrak *n*-heksana dipekatkan lalu disabunkan dalam 10 mL KOH 10%. Ekstrak *n*-heksana dikentalkan lalu diuji fitokimia dan uji aktivitas antibakteri.

Uji aktivitas antibakteri

Ekstrak *n*-heksanaa diuji aktivitasnya terhadap bakteri *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan tahap – tahap sebagai berikut :

1. Diambil sebanyak satu koloni biakan bakteri *Eschericia coli* dengan menggunakan jarum ose yang dilakukan secara aseptis.
2. Dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 2 mL Mueller-Hinton broth kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C .
3. Suspensi bakteri homogen yang telah diinkubasi siap dioleskan pada permukaan media Mueller-Hinton agar, secara merata dengan menggunakan lidi kapas yang steril.

4. Kemudian ditempelkan disk yang berisi sampel, standar tetrasiklin serta pelarutnya (*n*-heksana) yang digunakan sebagai kontrol.
5. Lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C .
6. Dilakukan pengukuran daya hambat zat terhadap bakteri.
7. Untuk biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara yang sama seperti biakan bakteri *Eschericia coli*, namun suhunya berbeda yaitu pada suhu 37°C

Ekstrak yang positif terpenoid dan paling aktif antibakteri dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 dan fase gerak kloroform : metanol (3 : 7). Fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom diuji fitokimia dan uji aktivitas antibakteri. Fraksi yang positif terpenoid dan paling aktif antibakteri dilanjutkan ke tahap pemurnian menggunakan kromatografi lapis tipis.

Isolat yang relatif murni selanjutnya diidentifikasi menggunakan kromatografi gas – spektroskopi massa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi dengan cara sokletasi dan maserasi menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana pada kedua cara tersebut positif mengandung senyawa terpenoid. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya warna ungu setelah ekstrak *n*-heksana direaksikan dengan Pereaksi Lieberman Burchard. Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap ekstrak *n*-heksana hasil sokletasi memberikan daya hambat yang lebih besar dibandingkan ekstrak *n*-heksana hasil maserasi. Terhadap ekstrak *n*-heksana hasil sokletasi dipisahkan menggunakan kromatografi kolom menghasilkan tiga buah fraksi yang dipaparkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kelompok fraksi hasil kromatografi kolom

No	Fraksi	Jumlah Noda	Rf	Warna Ekstrak
1	A (1-27)	1	0,725	Kuning
2	B (28-33)	2	0,690 dan 0,600	Kuning Muda
3	C (34-)	1	0,580	Kuning Muda

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa fraksi A dan fraksi C positif terpenoid yaitu memberikan warna merah muda (positif diterpenoid) pada fraksi A dan warna ungu muda

(positif triterpenoid) pada fraksi C setelah direaksikan dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Hasil ini dipaparkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji fitokimia masing – masing fraksi hasil kromatografi kolom

Nama fraksi	Warna larutan sebelum direaksikan dengan pereaksi Lieberman-Burchard	Warna larutan sebelum direaksikan dengan pereaksi Lieberman-Burchard	Keterangan
Fraksi A	kuning muda	merah muda	Positif terpenoid (diterpenoid)
Fraksi B	kuning muda	hijau kebiruan	Negatif terpenoid (steroid)
Fraksi C	kuning	ungu muda	Positif terpenoid (triterpenoid)

Fraksi yang positif terpenoid selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri. Hasil uji

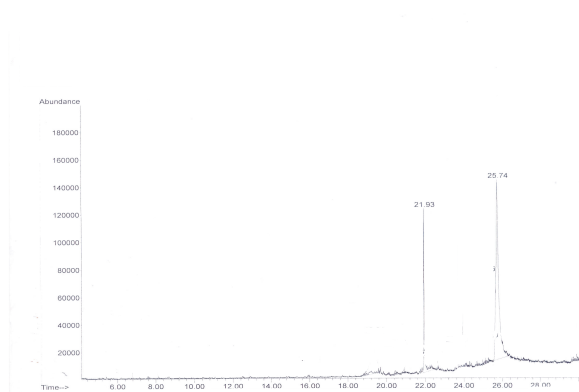
aktivitas antibakteri terhadap fraksi A dan fraksi C dipaparkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi A dan fraksi C

No	Ekstrak <i>n</i> -heksana	Diameter Hambatan Masing-Masing Zona Bakteri (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922
		1.	Kontrol <i>n</i> -heksana
2.	Akuades	0	2.
3.	Standar tetrasiklin 30 µg	42	3.
4.	Fraksi A 30 µg	19	4.
5.	Fraksi C 30 µg	12	5.

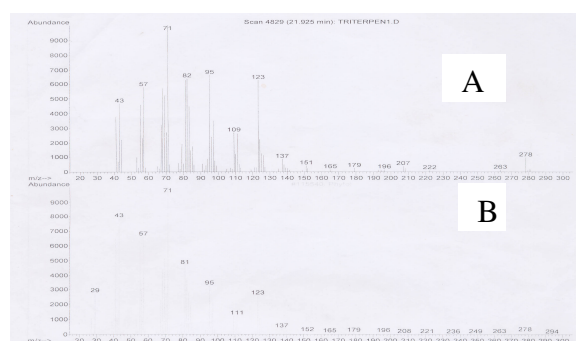
Dari hasil uji aktivitas antibakteri fraksi A memberikan daya hambat yang lebih baik sehingga fraksi A dilanjutkan ke tahap pemurnian. Hasil pemurnian menunjukkan noda tunggal. Hal ini dapat dikatakan fraksi A relatif murni secara KLT. Isolat yang relatif murni diidentifikasi menggunakan kromatografi gas – spektroskopi massa.

Kromatogram gas fraksi *n*-heksana positif terpenoid dan aktif antibakteri ditampilkan pada Gambar 4 yang menunjukkan terdapatnya dua buah puncak dengan waktu retensi berturut-turut : 25,74 dan 21,93 menit. Berdasarkan data di atas senyawa tersebut mengandung dua buah senyawa.



Gambar 1 Kromatogram gas fraksi A

Identifikasi senyawa pada puncak I tr 25.74 menit.



Gambar 1 Spektrum massa senyawa puncak I (A) dan spektrum massa phytol (B)

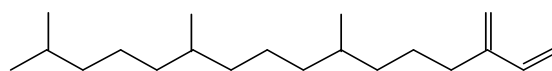
Spektrum massa senyawa puncak I ditampilkan pada Gambar 2. Berdasarkan data spektrum, senyawa pada puncak I mempunyai berat molekul m/z 278. Berdasarkan data base kromatografi gas - spektroskopi massa ditampilkan senyawa yang memiliki kemiripan 83% dengan senyawa pada puncak I. Senyawa tersebut adalah *phytol* dengan berat molekul m/z 296[M⁺], spektrum massanya ditampilkan pada Gambar 2 dan strukturnya ditampilkan pada Gambar 3. *Phytol* dapat mengalami dehidrasi secara alami menjadi *phytadiene* pada kelompok B dari *Botryococcus braunii* dimana *Botryococcus braunii* merupakan salah satu spesies dari alga hijau (Zang dan Sach, 2006; Fukushima *et al.*, 1992; Grossi *et al.*, 1996). Data spektroskopi massa dari *phytadiene* yaitu m/z 278[M⁺], 263, 179, 123, 109, 95, 82, 68, 57 (Nguyen *et al.*, 2002). Spektrum massa *phytadiene* menyerupai spektrum massa senyawa puncak I m/z 278[M⁺]. Pada spektrum massa

dodekane terdapat puncak dasar m/z 57 yang diapit oleh puncak tinggi lainnya yaitu puncak m/z 43 dan m/z 71 (Baker, 2000) yang merupakan puncak khas dodekane. Pada spektrum massa puncak I terdapat puncak m/z 71 sebagai puncak dasar dan muncul pula puncak khas lainnya dari dodekane yaitu puncak m/z 43 dan m/z 57 dengan kelimpahan yang cukup tinggi. Hal ini berarti senyawa puncak I mempunyai gugus seperti dodekane. Dodekane memiliki 20 atom C dan adanya ikatan rangkap (Baker, 2000), hal ini juga terlihat pada struktur *phytadiene* yang tersusun atas 20 atom C dan dua buah ikatan rangkap yang ditampilkan pada gambar 4. Setelah difragmentasi, struktur *phytadiene* mengikuti pola fragmentasi senyawa pada puncak I. Pola fragmentasi senyawa *phytadiene* ditampilkan pada Tabel 4 dan Gambar 5. Dengan demikian senyawa pada puncak I m/z 278 diduga sebagai senyawa *phytadiene* berdasarkan data Spektroskopi Massa, pola fragmentasi dan hubungan antara

senyawa puncak I dengan *phytol*, *phytadiene* dan dodekane.



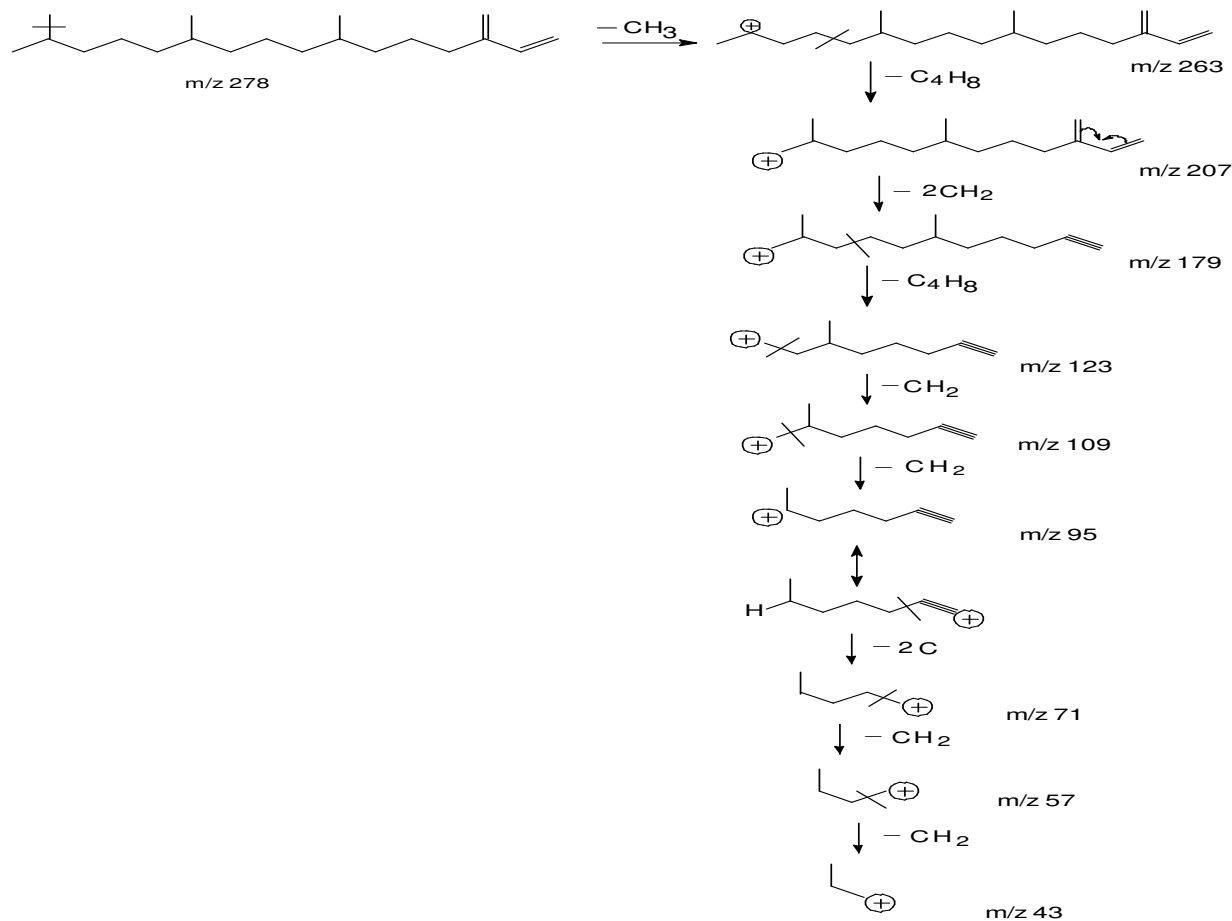
Gambar 3 Struktur senyawa phytol



Gambar 4 Struktur senyawa phytadiene

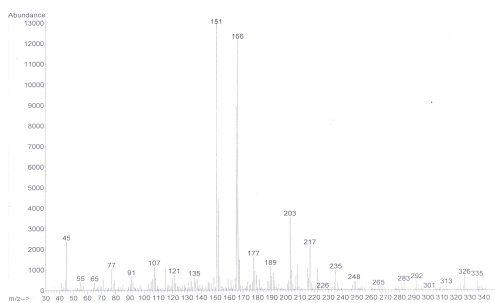
Tabel 4. Pola pemenggalan spektrum massa senyawa pada puncak I

Berat Molekul	M ⁺ -Pemenggalan	Rumus Molekul Pemenggalan	Rumus Molekul Penggalan
278 (M ⁺)			C ₂₀ H ₃₈
263	M ⁺ - 15	CH ₃	C ₁₉ H ₃₅ ⁺
207	M ⁺ - 15-56	C ₄ H ₈	C ₁₅ H ₂₇ ⁺
179	M ⁺ - 15-56-28	2CH ₂	C ₁₃ H ₂₃ ⁺
123	M ⁺ -15-56-28-56	C ₄ H ₈	C ₉ H ₁₅ ⁺
109	M ⁺ - 15-56-28-56-14	CH ₂	C ₈ H ₁₃ ⁺
95	M ⁺ - 15-56-28-56-14-14	CH ₂	C ₇ H ₁₁ ⁺
71	M ⁺ - 15-56-28-56-14-14-24	2C	C ₅ H ₁₁ ⁺
57	M ⁺ - 15-56-28-56-14-14-24-14	CH ₂	C ₄ H ₉ ⁺
43	M ⁺ - 15-56-28-56-14-14-24-14-14	CH ₂	C ₃ H ₇ ⁺



Gambar 5 Pola fragmentasi spektrum massa senyawa pada puncak I

Identifikasi Senyawa Pada Puncak II tr 21,93 menit



Gambar 6 Spektrum Massa senyawa puncak II

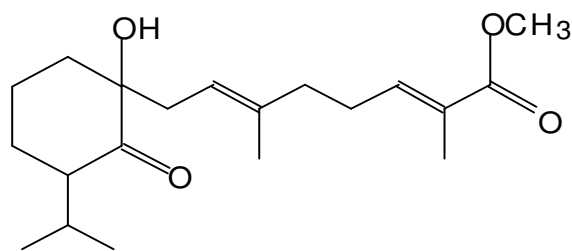
Spektrum senyawa pada puncak II ditampilkan pada gambar 6. Dari data spektrum, senyawa puncak II memiliki berat molekul m/z 335. Berdasarkan hasil penelusuran internet, terdapat beberapa buah senyawa dengan m/z 335 diantaranya DL-Leucyl-glycyl-DL-phenylalanine, 4-metoksi-4-metil-1-(4-nitrophenyl)-decane-1,3-dione, 2-{1-[2-(3,4-dimethoxyanilino)-2-oxoethyl]cyclohexyl}acetic acid, 2-(acetilamino)-3-{3-(cyclopentylmethoxy)-2-methoxyphenyl}propanoic acid. Senyawa-senyawa tersebut memang memiliki berat molekul m/z 335 sesuai dengan m/z senyawa pada puncak II tetapi pola fragmentasi senyawa-

senyawa tersebut tidak memenuhi pola fragmentasi senyawa pada puncak II. Oleh karena itu ditelusuri senyawa yang memiliki berat molekul m/z 336 yang memiliki pola fragmentasi yang memenuhi pola fragmentasi senyawa puncak II dengan asumsi bahwa senyawa dengan berat molekul m/z 336 adalah senyawa yang memiliki berat molekul m/z 335 $[M^+ - H]$.

Berdasarkan data hasil penelusuran internet, terdapat struktur senyawa yang memiliki berat molekul m/z 336 dengan gugus dan pola fragmentasi yang memenuhi gugus dan pola fragmentasi senyawa pada puncak II. Senyawa tersebut adalah 1,2-*seco-cladiellan* (Friedal *et al.*, 2005), strukturnya ditampilkan pada gambar 7. Senyawa 1,2-*seco-cladiellan* terbentuk dari karvon (Friedal *et al.*, 2005) dimana karvon merupakan senyawa golongan monoterpenoid yang mengandung gugus keton (Ikan, 1976). Terdapatnya gugus keton pada sebuah spektrum massa suatu senyawa terlihat pada puncak m/z 55 dan adanya pemecahan yang terjadi pada ikatan C – C sebelah atom oksigen

(Silverstain *et al.*, 1986). Pada senyawa puncak II terlihat adanya puncak m/z 55 dan pemecahan ikatan C – C sebelah atom oksigen dapat terlihat pada m/z 292 ($M^+ - H - 43$) yang kehilangan molekul C_3H_7 .

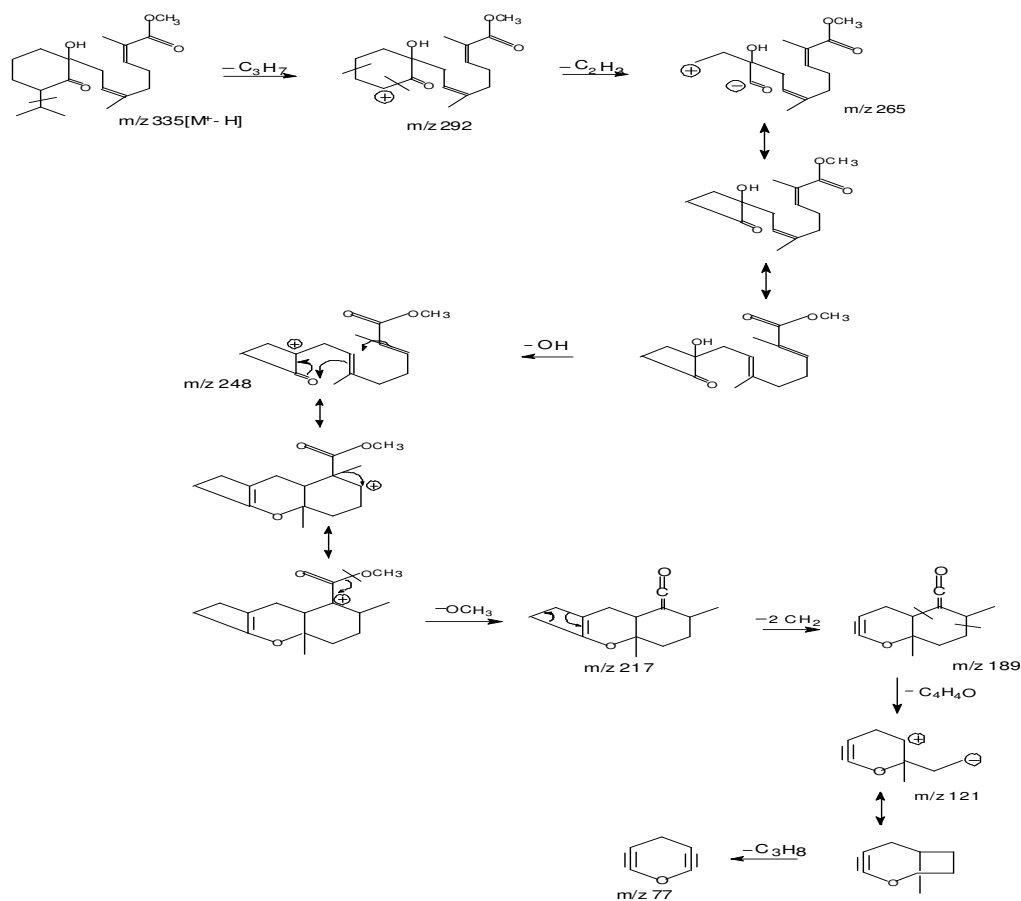
Berdasarkan data di atas ditarik suatu kesimpulan yaitu senyawa puncak II diduga sebagai senyawa 1,2-*seco-cladiellan*, karena struktur senyawa ini memenuhi pola fragmentasi senyawa puncak II.



Gambar 7 Struktur senyawa 1,2-*seco-cladiellan*

Tabel 5. Pola pemenggalan spektrum massa senyawa pada puncak II

Berat molekul	$[M^+ - H]$ - pemenggalan	Rumus molekul pemenggalan	Rumus molekul penggalan
336[M+]			$C_{20}H_{32}O_4$
335[M ⁺ -H]			$C_{20}H_{31}O_4$
292	$[M^+ - H] - 43$	C_3H_7	$C_{17}H_{24}O_4^+$
265	$[M^+ - H] - 43 - 27$	C_2H_3	$C_{15}H_{21}O_4^+$
248	$[M^+ - H] - 43 - 27 - 17$	OH	$C_{15}H_{20}O_3^+$
217	$[M^+ - H] - 43 - 27 - 17 - 31$	OCH ₃	$C_{14}H_{17}O_2^+$
189	$[M^+ - H] - 43 - 27 - 17 - 31$	2CH ₂	$C_{12}H_{13}O_2^+$
121	$[M^+ - H] - 43 - 27 - 17 - 31$	C_4H_4	$C_8H_9O^+$
107	$[M^+ - H] - 43 - 27 - 17 - 31 - 14$	CH ₂	$C_7H_7O^+$
77	$[M^+ - H] - 43 - 27 - 17 - 31 - 14 - 30$	2CH ₃	C_5HO^+



Gambar 8. Pola fragmentasi spektrum massa senyawa pada puncak II

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) mengandung dua senyawa terpenoid yang diduga jenis phytadiene dan 1,2-seco cladiellan, di mana campuran kedua senyawa ini aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC® 25292 dan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC® 25293.

Saran

Perlu dilakukan uji aktivitas lain untuk mengetahui keaktifan dari isolat terpenoid dari Herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Ibu Ketut Ratnayani, S.Si., M.Si., Ibu Ida Ayu Gede Widihati, S.Si., M.Si., dan Ibu Ni Luh Putu Rustini, S.Si., M.Si., atas masukan dan sarannya sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

Anonim, 2005, Meniran, <http://www.pdpersi.co.id/pdpersi/news/alternative.php3?id=1012>, 5 Desember 2005

- Anonim, 2007, *Eclipta prostrata*, dumentat.smbh.Univ_paris13.fr/med/tradmed2001.htm, 4 januari 2007
- Anonim, 2007, Tetra pleura, www.diss.fu.berlin.de/2003/81/koehler_7.pdf-332k, 24 Januari 2007
- Baker, J., 2000, *Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons Ltd, England
- Bigham, A. K., Munro, A. T, Rizzacasa, M. A., Roy, M., and Browne, R., 2003, *Divinatorins A-c, New Neoclerodane Diterpenoid from the controlled sage *Silvia divinorum**, Melbourn University, Victoria, 3010, Australia
- Friedal, M., Neckar., and Lauffen., 2005, *Zur Synthese des Diterpenoids Eleutherobin aus Weichkorallen der Gattung *Eleutherobia* und Synthese der Aminosäure 2-Aminohomohistidin*, Universität München, München
- Fukushima, K., Yakusawa, M., Muto, N., Uemura, T., and Ishiwatari, R., 1992, Formation of C20 Isoprenoid Thiophenes in Modern Sediment, *Organic Geochemistry*, 18 : 83-91
- Grayson, D. H., 2000, *Monoterpenoid*, University Chemical Laboratory, Trinity College, Dublin 2, Ireland
- Grossi, V., Baas, M., Schogt, N., Klein Breteler, W. C. M., De Leeuw, J. W., and Rontani, J. F., 1996, Formation of Phytadienes in water column : myth or reality? *Organic Geochemistry*, 24 : 833-839
- Heyne, 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid II, Yayasan Sauna Wana Jaya, Jakarta
- Ikan, R., 1976, *Natural Product A Laboratory Guide*, Academic Press, London
- Kardinan, A. dan Kusuma, F. R., 2004, *Meniran Penambah Daya Tahan Tubuh Alami*, Agromedia Pustaka, Jakarta
- Lim, S. Y., Bauermeister, A., Kjonaas, R. A., and Gosh, S. K., 2006, *Phytol-Based Novel Adjuvants in Vaccine Formulation: 2. Assessment of Efficacy in the Induction of Protective Immune Responses to Lethal Bacterial Infections in Mice*, Departement of Life Science, Indiana State University, Terre Haute, IN 47809, USA
- Mangan, Y., 2003, *Cara Bijak Menaklukan Kanker*, Agromedia Pustaka, Jakarta
- Nguyen, R. T., Harvey, H. R., Zang, X., Heemst, J.D.H., Hetenyi, M., and Hatcher, P.G., 2002, *Prevention of algaenan and proteinaceous material during the oxic decay of *Botryococcus braunii* as revealed by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry and ¹³C NMR Spectroscopy*, Ohio State University, Colombus, USA
- Osward, T. T., 1995, *Tumbuhan Obat*, Baratha, Jakarta
- Silverstain, R. M., Bassler, G. C., and Morrill, T. C., 1986, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4th ed., a.b. Hartono, A. J., dkk., Erlangga, Jakarta
- Zang, Z. and Sach, J. P., 2006, *Hydrogen Isotop Fractination In Fresh Water Algae: I Variation Among Lipids And Species*, Department Earth Atmospheric and Planetary Sciences, Cambridge, United State America