



Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis L.*) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri

Wihda Wihdatul Hidayah^a, Dewi Kusriani^{a*}, Enny Fachriyah^a

^a Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang

* Corresponding author: dewi.kusriani@live.undip.ac.id

Article Info

Keywords:
getih-getihan, n-hexane extract, steroid, antibacterial

Kata Kunci:
getih-getihan, ekstrak n-heksana, steroid, antibakteri

Abstract

Isolation and identification of steroid compounds from the leaves of getih-getihan (*Rivina humilis L.*) and its antibacterial activity test have been performed. The isolation was carried out by maceration of 2,708 kg of dried powder from Getih-getihan leaves using ethanol solvent, then partitioned with n-hexane solvent which yielded 2.4 gram of n-hexane extract. Phytochemical tests using Liebermann-Burchard reagents showed that n-hexane extracts were positive containing steroids. Separation of n-hexane extracts by column chromatography yielded 5 large fractions (A, B, C, D, E) and a steroid-positive B fraction resulting in isolates of 0.3 mg. The steroid isolates were tested for purity by TLC method with various solvents. From two-dimensional TLC, one stain was obtained and the isolates were suspected to have been pure. The steroid isolates were analyzed using GC-MS, however the structure could not be determined yet. The antibacterial activity test of n-hexane extract on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria showed inhibition of bacterial growth at 1000 ppm concentration.

Abstrak

Isolasi dan identifikasi senyawa steroid dari daun getih-getihan (*Rivina humilis L.*) dan uji aktivitasnya sebagai antibakteri telah dilakukan. Isolasi dilakukan dengan maserasi dari 2,708 kg serbuk kering dari daun getih-getihan menggunakan pelarut etanol, kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksana yang menghasilkan ekstrak n-heksana sebanyak 2,4 gram. Uji fitokimia menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana positif mengandung steroid. Pemisahan ekstrak n-heksana dengan kromatografi kolom menghasilkan 5 fraksi besar (A, B, C, D, E) dan fraksi B yang positif steroid menghasilkan isolat sebanyak 0,3 mg. Isolat steroid diuji kemurnian dengan metode KLT dengan berbagai pelarut. Dari KLT dua dimensi, didapatkan satu noda dan diduga isolat telah murni. Isolat steroid dianalisis menggunakan spektroskopi GC-MS, namun belum dapat ditentukan strukturnya. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak n-heksana terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menunjukkan penghambatan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 1000 ppm.

1. Pendahuluan

Seiring perkembangan jaman dan adanya slogan *back to nature* membuat masyarakat Indonesia cenderung meman-faatkan tumbuhan obat sebagai obat tradisional. Salah satu tumbuhan yang berpotensi menjadi obat tradisional adalah getih-getihan (*Rivina humilis L.*) yang

merupakan tumbuhan berfamili *phytolaccaceae* yang biasa dikenal dengan sebutan *pigeon berry* [1]. Tumbuhan ini biasanya tumbuh liar dan belum banyak dimanfaatkan di Indonesia. Menurut Fathima dan Tilton [2] daun getih-getihan yang berasal dari India mengandung flavonoid, alkaloid, quinon, terpenoid,

steroid, saponin, dan tanin serta pada ekstrak metanolnya mempunyai aktivitas antioksidan dan aktivitas antibakteri [3]. Buahnya yang berwarna merah dapat digunakan sebagai sumber pigmen betalain yang memiliki aktivitas antiinflamasi, anti-karsinogenik, anti-malaria, pelindung saraf [1].

Berdasarkan kemotaksonominya, tumbuhan yang satu famili (*Phytolaccaceae*) dengan getih-getihan yaitu Singawalang (*Petiveria alliacea*) dan *Hillieria latifolia*. Singawalang (*Petiveria alliacea*) memiliki kandungan metabolit sekunder yaitu saponin glikosida, isoarborinol-triterpen, isoarborinol-asetat, steroid, alkaloid, isoarborinolsinamat, flavonoid, dan tanin serta mempunyai aktivitas antibakteri, bioinsektisida, antikanker, dan antiinflamasi [4]. Sedangkan *Hillieria latifolia* mengandung tanin, glikosida, saponin, alkaloid, flavonoid, steroid dan terpenoid dan mempunyai aktivitas antinoseptif dan antiinflamasi.

Steroid merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder. Golongan senyawa tersebut diketahui mempunyai aktivitas bioinsektisida [5], antibakteri [6, 7], antifungi [8], dan antidiabetes. Belum adanya penelitian terkait jenis senyawa steroid yang terdapat pada daun getih-getihan, maka perlu dilakukan isolasi, identifikasi senyawa steroid dari daun getih-getihan (*Rivina humilis L.*) dan uji aktivitas sebagai antibakteri.

2. Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Blender, neraca analitik, gelas ukur, gelas beker, pipet tetes, erlenmeyer, botol vial, pengaduk, rotary evaporator, kertas saring, corong gelas, corong pisah, cawan penguapan, chamber KLT, pipa kapiler, kromatografi kolom, cawan petri, inkubator, jarum ose, autoklaf, lampu UV 254 nm dan 365 nm, spektroskopi GC-MS TQ 8030. Daun getih-getihan, etanol 96%, aquades, n-heksana, kloroform, etil asetat, pereaksi Liebermann-Burchard, kloroform p.a., n-heksana p.a., etanol p.a., benzena p.a., metanol p.a., plat silika gel 60 GF₂₅₄, silika gel 60 G, bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, tetrasiklin, DMSO, nutrient broth, nutrient agar.

Preparasi Sampel

Sampel daun getih-getihan basah sebanyak 22 kg dicuci, dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian dihaluskan menggunakan blender sehingga diperoleh serbuk simplisia.

Isolasi Senyawa Steroid

Sebanyak 2,708 kg serbuk daun getih-getihan dimaserasi selama 24 jam menggunakan pelarut etanol 10 L dengan pergantian pelarut setiap 24 jam sekali. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator, sehingga diperoleh ekstrak pekat etanol. Kemudian ekstrak pekat etanol dihilangkan klorofil dengan penambahan aquades (1:1) ke dalam ekstrak pekat etanol didiamkan selama 24 jam dan dilakukan penyaringan. Ekstrak etanol-aquades hasil

penyaringan dipartisi menggunakan pelarut n-heksana, kemudian ekstrak n-heksana dipekatkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak n-heksana sebanyak 2,4 gram. Selanjutnya dilakukan uji steroid menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard.

Penapisan Fitokimia Berdasarkan Harborne [9]

Uji Saponin

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL aquades, kemudian dikocok kuat secara vertikal dan ditambahkan HCl. Adanya saponin ditunjukkan dengan timbulnya busa yang tetap stabil dalam larutan setelah penambahan HCl.

Uji Flavonoid

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan serbuk Mg, 1 mL HCl 2M dan 2 mL amilalkohol, dilakukan pengocokkan. Adanya perubahan warna larutan menjadi kuning menunjukkan adanya flavonoid.

Uji Alkaloid

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan ammonia 25% dan ditambahkan kloroform. Kemudian diekstraksi dengan HCl 10%. Selanjutnya ditambahkan pereaksi dragendroff. Adanya endapan merah menunjukkan adanya alkaloid.

Uji Triterpenoid

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL n-heksana, dikocok. Lapisan n-heksana ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Adanya perubahan warna menjadi merah menunjukkan adanya triterpenoid.

Uji Steroid

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL n-heksana, dikocok. Lapisan n-heksana ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Adanya perubahan warna menjadi biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.

Uji Tanin

Sebanyak 2 mL ekstrak etanol ditambahkan 2 mL FeCl₃ 1%, kemudian dilakukan pengocokkan. Adanya perubahan warna larutan menjadi coklat kehitaman menunjukkan adanya tanin.

Pemisahan Senyawa Steroid

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak n-heksana dilakukan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui jumlah komponen senyawa dalam ekstrak dan menentukan eluen yang cocok untuk kromatografi kolom. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana, kloroform, dan campuran eluen n-heksana: kloroform (2:7), n-heksana: kloroform (3:7), n-heksana: kloroform (2:8).

Kromatografi Kolom

Ekstrak kental n-heksana dipisahkan menggunakan kromatografi kolom. Silika gel 60G digunakan sebagai fasa diam dan eluen n-heksana, kloroform, etil asetat yang dialirkan secara gradien berdasarkan peningkatan

kepolaran dan ditampung dalam vial tiap 15 mL. Fraksi-fraksi hasil kolom selanjutnya di KLT untuk mengelompokkan senyawa menjadi fraksi-fraksi besar (A, B, C, D, E). Fraksi (A, B, C, D, E) selanjutnya dilakukan pengujian steroid menggunakan KLT dengan penampak bercak Liebermann-Burchard untuk menunjukkan fraksi positif steroid.

KLT Preparatif

Fraksi positif steroid dipisahkan menggunakan metode KLT preparatif dengan fasa diam silika gel dan eluen n-heksana: kloroform (8: 2) dengan ketebalan silika gel 2 mm dan panjang lapisan 20 cm serta lebar 20 cm, sehingga diperoleh isolat steroid.

Uji Kemurnian

Isolat steroid hasil KLT preparatif dilakukan uji kemurnian untuk mengetahui kemurnian senyawa pada KLT yang ditunjukkan dengan adanya satu noda tunggal. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana, benzena, metanol, n-heksana: metanol (1:1), n-heksana: kloroform (8:2), n-heksana:benzena (1:1) dan KLT dua dimensi dengan eluen n-heksana: kloroform (8:2) dan n-heksana.

Identifikasi Steroid

Isolat steroid selanjutnya diidentifikasi menggunakan spektroskopi GC-MS.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram terhadap bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli*). Ekstrak n-heksana diuji berbagai konsentrasi (b/v) 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm. Untuk mengetahui efektivitas bakteri uji digunakan pembanding antibiotik yaitu tetrasiklin [10]. Isolat bakteri uji yang telah dikultur dalam *nutrient broth* diinokulasikan pada permukaan *nutrient agar* sebanyak 20 µL menggunakan *spreader*. Ekstrak n-heksana berbagai variasi ditetaskan pada kertas cakram, selanjutnya kertas cakram yang telah mengandung ekstrak diletakkan pada permukaan media inokulasi menggunakan pinset. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk diukur dengan jangka sorong.

3. Hasil Dan Pembahasan

Penelitian yang berjudul isolasi, identifikasi senyawa steroid dari daun getih-getihan (*Rivina humilis* L.) dan uji aktivitas sebagai antibakteri dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang.

Preparasi Sampel

Daun getih-getihan yang sudah bersih dilakukan pengeringan untuk dijadikan simplisia dengan cara diangin-anginkan bertujuan untuk menghilangkan kadar air dan mencegah terjadinya kerusakan senyawa yang terkandung dalam sampel. Kemudian dijadikan

serbuk menggunakan blender bertujuan untuk memperluas permukaan sampel, sehingga pelarut lebih mudah masuk ke dalam jaringan daun dalam mengekstrak senyawa yang terdapat di dalamnya dan menghasilkan simplisia sebanyak 2,708 kg (rendemen 12,31%).

Isolasi Senyawa Steroid

Isolasi steroid dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol menghasilkan ekstrak etanol berwarna hijau tua. Etanol merupakan pelarut universal yang berfungsi untuk mengambil semua senyawa organik yang terkandung dalam sampel daun getih-getihan karena pelarut etanol dapat masuk ke dalam jaringan tumbuhan, sehingga banyak senyawa yang terekstrak di dalamnya. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*, sehingga menghasilkan ekstrak pekat etanol sebanyak 40,25 g.

Ekstrak pekat etanol daun getih-getihan dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui kandungan kimianya. Hasil pengujian menunjukkan daun getih-getihan mengandung senyawa fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, triterpenoid, steroid, dan tanin dapat dilihat pada tabel 1.

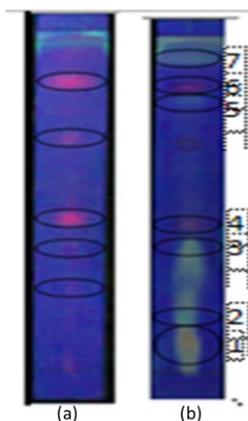
Tabel 1: Hasil penapisan fitokimia daun getih-getihan

Golongan	Ekstrak etanol
Fenolik	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Alkaloid	+
Triterpenoid	+
Steroid	+
Tanin	+

Selanjutnya ekstrak pekat etanol dihilangkan klorofilnya dengan penambahan aquades (1:1). Hal ini bertujuan untuk memudahkan isolasi senyawa steroid yang terkandung di dalamnya karena klorofil merupakan senyawa pengotor. Filtrat etanol-aquades selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksana untuk mengambil senyawa non polar, seperti steroid dan triterpenoid.

Ekstrak pekat n-heksana yang diperoleh dilakukan identifikasi dengan pereaksi Liebermann-Burchard (LB) yang menghasilkan warna biru kehijauan yang menunjukkan adanya senyawa steroid.

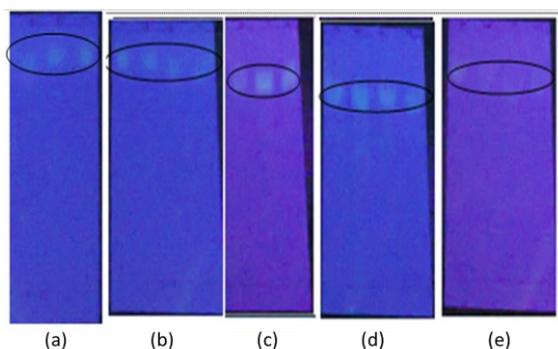
Untuk mengetahui jumlah komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi n-heksana dilakukan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fasa diam yang digunakan adalah silika gel 60F₂₅₄ dan eluen n-heksana: kloroform (2:8) diperoleh 7 noda pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil KLT fraksi n-heksana:kloroform (2:8) dengan pereaksi Liebermann-Burchard dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Pemisahan Senyawa Steroid

Pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom menghasilkan 189 vial. Selanjutnya dilakukan KLT fraksi-fraksi hasil kolom untuk mengelompokkan pola noda yang sama. Dari vial-vial hasil kolom diperoleh 5 fraksi besar (A, B, C, D, E). Hasil KLT penggabungan fraksi-fraksi hasil kolom dapat dilihat pada gambar 2.



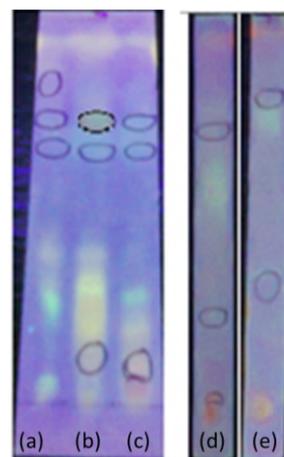
Gambar 2. Hasil penggabungan fraksi-fraksi hasil kolom dengan eluen etanol:aseton (2:1) dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Nilai Rf hasil penggabungan fraksi-fraksi hasil kolom dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2: Data penggabungan fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom

Fraksi	Vial	Rf
A	21-60	0,87
B	61-115	0,83
C	116-135	0,77
D	136-164	0,67
E	165-189	0,81

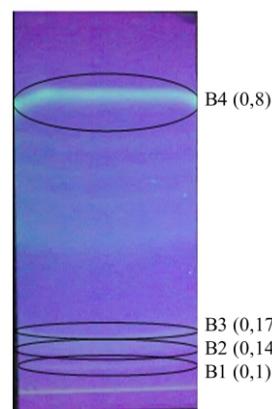
Dari masing-masing fraksi A, B, C, D, E yang diperoleh selanjutnya dianalisis kembali menggunakan KLT untuk mengetahui adanya senyawa steroid. Fraksi yang mengandung steroid ditunjukkan dengan noda berwarna biru kehijauan setelah disemprot pereaksi Liebermann-Burchard (LB). Hasil KLT fraksi A, B, C, D, E, dengan LB ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil KLT fraksi A, B, C, D, E pada uji steroid dengan pereaksi Liebermann-Burchard dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Dari hasil KLT gambar 3, fraksi B terlihat ada noda yang berwarna biru kehijauan setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang menunjukkan fraksi B positif steroid.

Selanjutnya fraksi B dilakukan kromatografi preparatif untuk memisahkan isolat steroid menggunakan eluen terbaik campuran n-heksana:kloroform (8:2) menggunakan fasa diam silika gel dengan ketebalan silika gel 2 mm dan panjang lapisan 20 cm serta lebar 20 cm. Hasil KLT preparatif fraksi B dapat dilihat pada gambar 4.

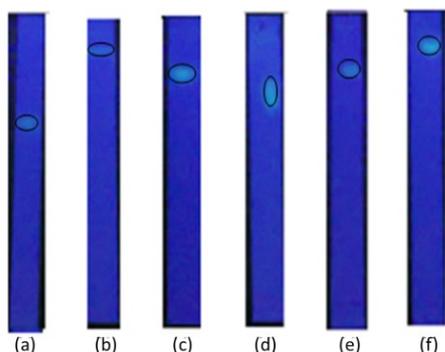


Gambar 4. Hasil KLT preparatif fraksi B dilihat di bawah lampu UV 365 nm

Hasil KLT preparatif menunjukkan adanya 4 pita (B1, B2, B3, B4). Pita B4 dengan Rf 0,8 berwarna biru terang mengindikasikan adanya senyawa steroid. Kemudian pita B4 dikerok dan dilarutkan dalam n-heksana pro analisis untuk mendapatkan isolat steroid setelah dipisahkan dengan silika gel dan diuapkan, diperoleh isolat steroid sebanyak 0,3 mg. Selanjutnya untuk mengetahui kemurnian isolat yang diperoleh dilakukan uji kemurnian dengan metode KLT berbagai eluen dan KLT dua dimensi.

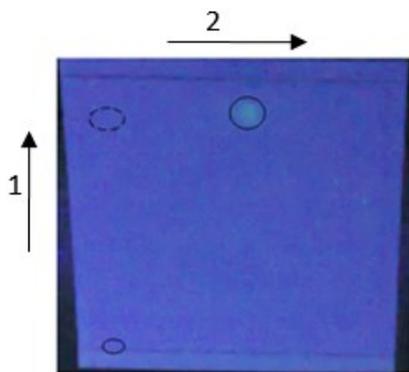
Isolat steroid dilakukan uji kemurnian dengan metode KLT berbagai eluen dan KLT dua dimensi. Eluen yang digunakan yaitu n-heksana, benzena, metanol, n-heksana: metanol (1:1), n-heksana: kloroform (8:2), n-

heksana: benzena (1:1). KLT dua dimensi dielusi dengan eluen pertama n-heksana: kloroform (8:2) dan kedua n-heksana untuk mengetahui apakah steroid dari hasil kromatografi preparatif sudah murni. Uji kemurnian didapatkan satu noda yang diduga isolat telah murni, ditunjukkan pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil KLT pada uji kemurnian pita B4 hasil kromatografi preparatif dengan eluen: (a) n-heksana, (b) benzena, (c) metanol, (d) n-heksana:metanol (1:1), (e) n-heksana:kloroform (8:2), (f) n-heksana:benzena (1:1) pada lampu UV 365 nm

Uji kemurnian dilakukan kembali dengan KLT dua dimensi menggunakan eluen yang berbeda pada elusi pertama dan kedua. Elusi pertama dilakukan menggunakan eluen n-heksana: kloroform (8:2) dan setelah diputar 90o elusi kedua menggunakan eluen n-heksana. Hasil KLT dua dimensi ditunjukkan pada gambar 6.



Gambar 6. Hasil uji kemurnian KLT dua dimensi dengan eluen (1) n-heksana:kloroform (8:2) dan (2) n-heksana pada lampu UV 365 nm

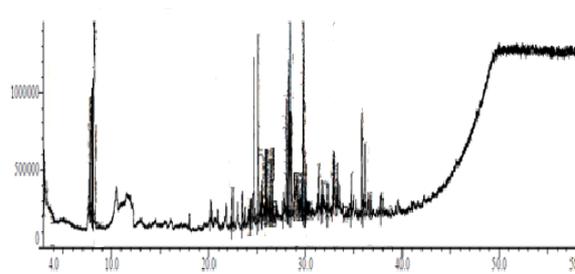
Hasil uji kemurnian KLT dua dimensi menghasilkan satu noda pada setiap elusinya. Hal ini menunjukkan bahwa isolat diduga telah murni. Isolat yang dihasilkan berbentuk kristal kecil-kecil berwarna putih sebesar 0,3 mg.

Selanjutnya isolat diidentifikasi menggunakan spektroskopi GC-MS untuk mengetahui tingkat kemurnian senyawa dan waktu retensi serta mengetahui berat molekul dan pola fragmentasi dari isolat.

Identifikasi Steroid dengan GC-MS

Isolat steroid diidentifikasi dengan GC-MS TQ8030 Shimadzu. Alat GC-MS menggunakan kolom jenis Rtx-

5MS dengan panjang 30 meter dan diameter internal 0,25mm. Gas pembawa yang digunakan adalah helium. Kondisi alat GC-MS yang digunakan yaitu temperatur injektor 200°C, tekanan 86,2 kPa, aliran total 929,3 mL/menit, temperatur kolom terprogram 100oC selama 5 menit kemudian dinaikkan temperaturnya sebesar 50C/menit. Hasil analisis GC isolat steroid dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Kromatogram isolat steroid daun getih-getihan

Berdasarkan hasil kromatogram pada gambar 7 diperoleh 50 puncak senyawa yang menunjukkan bahwa isolat steroid belum murni dan tidak menunjukkan adanya senyawa steroid, sehingga belum mewakili isolat senyawa hasil isolasi. Kemungkinan hal tersebut terjadi karena kondisi operasional alat yang belum optimal sehingga senyawa steroid belum keluar dan belum bisa diketahui jenis steroidnya.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji antibakteri dari ekstrak n-heksana dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli* mewakili gram negatif dan *Staphylococcus aureus* mewakili gram positif. Pengujian dilakukan menggunakan metode difusi cakram dengan berbagai variasi konsentrasi (b/v) yaitu 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm.

Jumlah koloni bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diatur menggunakan standar Mc Farland 0,5. Selanjutnya dilakukan pengujian ekstrak n-heksana terhadap kedua bakteri uji yang telah divariasikan konsentrasinya dan diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan pengukuran diameter zona bening yang menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak terhadap bakteri uji

Konsentrasi ekstrak uji	Diameter hambatan (mm)	
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>
62,5 ppm	-	1,05
125 ppm	-	1,9
250 ppm	-	6,15
500 ppm	1,5	6,3
1000 ppm	9,85	6,5
Tetrasiklin 100 ppm (kontrol positif)	26	26
DMSO (kontrol negatif)	-	-

Hasil pengujian antibakteri pada tabel 3 dapat diketahui bahwa ekstrak n-heksana memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri ekstrak n-heksana terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 1000 ppm.

Terminalia muelleri Benth. Against *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Pharmacology*, 6, 4, (2010) 407-412

4. Kesimpulan

Isolat steroid telah diisolasi dari daun getih-getihan berbentuk kristal kecil-kecil berwarna putih. Struktur isolat steroid dengan spektroskopi GC-MS belum dapat ditentukan. Ekstrak n-heksana daun getih-getihan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 1000 ppm.

5. Daftar Pustaka

- [1] Mohammad Imtiyaj Khan, K. M. Denny Joseph, Muralidhara, H. P. Ramesh, P. Giridhar, G. A. Ravishankar, Acute, subacute and subchronic safety assessment of betalains rich *Rivina humilis* L. berry juice in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 49, 12, (2011) 3154-3157
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.022>
- [2] Mujeera Fathima, F Tilton, Phytochemical analysis and antioxidant activity of leaf extracts of *Rivina humilis* L, *International Journal of Current Research*, 4, (2012) 326-330
- [3] Antonnacci Salvat, L Antonnacci, Renee Hersilia Fortunato, Enrique Ysidro Suárez, HM Godoy, Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity, *Letters in applied microbiology*, 32, 5, (2001) 293-297
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00923.x>
- [4] Roman Kubec, Seokwon Kim, Rabi A. Musah, The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*, *Phytochemistry*, 63, 1, (2003) 37-40
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00759-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00759-8)
- [5] P Sugita, Latifah K Darusman, Tuti Setiawati, Steroid dari Ekstrak *Hopea* mengawan sebagai Bahan Baku Insektisida Bologis, *J. Buletin Kimia (2000)*, (2000) 37-41
- [6] S Lalitha, K Rajeshwaran, P Senthil Kumar, K Deepa, K Gowthami, In vivo screening of antibacterial activity of *Acacia mellifera* (BENTH)(Leguminosae) on human pathogenic bacteria, *Global Journal of Pharmacology*, 4, 3, (2010) 148-150
- [7] Fajar Budi Laksono, Enny Fachriyah, Dewi Kusriani, Isolasi dan Uji Antibakteri Senyawa Terpenoid Ekstrak N-Heksana Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*), *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 17, 2, (2014) 37-42
- [8] R Saraswathi, Upadhyay Lokesh, R Venkatakrishnan, R Meera, P Devi, Isolation and biological evaluation of steroid from stem of *Costus igneus*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2, 5, (2010) 444-448
- [9] Jeffrey Barry Harborne, Metode fitokimia, Padmawinata K, S. I, Institut Teknologi Bandung, Bandung, 1987.
- [10] K Anam, AG Suganda, EY Sukandar, L Broto S Kardono, Antibacterial effect of component of