

CYTOTOXIC ACTIVITIES OF ETHYL ACETATE FRACTIONS FROM PETROLEUM ETHER EXTRACT AND METHANOL EXTRACT OF PISTIAE LEAVES

AKTIVITAS SITOTOKSIK HASIL PARTISI ETIL ASETAT EKSTRAK PETROLEUM ETER DAN EKSTRAK METANOL DAUN KAYU APU (*Pistiae Folium*)

Sentot Joko Raharjo^{1*}, Rahayu Wahyu Ningsih²

¹Akademi Analis Farmasi dan Makanan "Putra Indonesia Malang", Jl Barito No.5 Malang, 65141.

²Akademi Farmasi "Putra Indonesia Malang", Jl. Barito No. 5 Malang, 65141, Indonesia

ABSTRACT

This study aims to explore the cyto toxic test (LC₅₀) towards Artemia salina L. larvae of the partition ethyl acetate fractions from methanol extracts and petroleum ether (PE) extracts of Pistiae folium. The leaves of Pistiae folium was extracted using solvents soxhletation with methanol solvent and petroleum ether solvent. Both extracts successively partitioned with n-hexane and ethyl acetate, respectively. Identification of secondary metabolites was using phytochemical screening method and TLC (Thin Layer Chromatography). TLC analysis was using the eluent chloroform: methanol 3: 1 by citroboric acid spot analysis. The cytotoxic activity was using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The result of partition from methanol extracts was 6.25% and from PE extracts was 0.69%. The phytochemical screening test showed that it contained flavonoids, saponins and steroids. The TLC analysis identified flavonoid compounds. The cytotoxic activity (LC₅₀) of the ethyl acetate partition from methanol extracts and petroleum ether extracts of Pistiae folium were 79.9298mg/mL and 51.7608mg/mL, respectively. The result showed that the cytotoxic activity of ethyl acetate fractions partitioned from methanol extract of Pistiae folium was higher than the PE extracts.

Key words: BSLT, ethyl acetate partition, methanol extract, petroleum ether extract, Pistiae folium, LC₅₀.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi uji sitotoksik (LC₅₀) larva Artemia salina L. dari hasil partisi etil asetat ekstrak petroleum eter (PE) dan ekstrak metanol daun kayu apu (Pistiae folium). Daun kayu apu diekstraksi menggunakan metode sokletasi dengan pelarut PE dan pelarut metanol. Kedua ekstrak berturut-turut dipartisi dengan n-heksan dan etil asetat. Identifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan metode skrining fitokimia dan KLT. Analisis KLT menggunakan eluen kloroform : metanol 3:1 dengan reaksi penampak sitroborat. Uji aktivitas sitotoksik dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Rendemen hasil partisi ekstrak PE sebanyak 0,69% dan metanol sebanyak 6,25%. Hasil skrining fitokimia menunjukkan adanya senyawa flavonoid, saponin dan steroid. Analisis KLT teridentifikasi positif senyawa flavonoid. Aktivitas sitotoksik LC₅₀ hasil partisi etil asetat terhadap ekstrak metanol dan ekstrak PE daun kayu apu berturut-turut 79,9298µg/mL dan 51,7608µg/mL. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas sitotoksik hasil partisi etil asetat dari ekstrak metanol daun kayu apu lebih tinggi daripada pada ekstrak PE.

Kata Kunci : BSLT, partisi etil asetat, ekstrak metanol, ekstrak petroleum eter, Pistiae Folium, LC₅₀.

PENDAHULUAN

Kayu apu (*Pistia stratiotes* L.) merupakan gulma air yang memiliki daun berwarna hijau kebiruan berbentuk seperti mawar dan tidak berbatang (Wirawan *et al.*, 2014). Tanaman kayu apu mengandung senyawa flavonoid, steroid, glikosida antrakuinon (Ahad *et al.*, 2011), antosianin, saponin, karbohidrat dan tanin (Tulika and Agarwal, 2014). Flavonoid merupakan

senyawa fenol yang dimiliki oleh sebagian besar tumbuhan hijau (Wirdani *et al.*, 2008). Flavonoid dilaporkan memiliki beberapa bioaktivitas seperti antiinflamasi, antibakteri, analgesik, antioksidan, dan antikarsinogenik (Ahad *et al.*, 2011).

Aspek utama yang diperhatikan dalam ekstraksi flavonoid adalah pemilihan pelarut. Senyawa flavonoid dapat diekstraksi menggunakan pelarut n-butanol (Asih & Setiawan, 2008), metanol (Widyawati *et al.*, 2010), etanol, etil asetat (Gustina, 2012) dan n-heksan (Musir *et al.*, 2009). Penelitian Karim *et al.* (2014)

Corresponding author : Sentot Joko Raharjo
Email : sentotjoko@yahoo.co.id

menunjukkan bahwa ekstrak petroleum eter (PE) tanaman kayu apu memiliki kandungan flavonoid dan aktivitas sitotoksik.

Aktivitas sitotoksik suatu senyawa dapat ditunjukkan melalui efek toksiknya terhadap sel. Senyawa bioaktif yang telah diekstraksi selanjutnya dimonitor aktivitasnya melalui pengujian *BSLT* (*Brine Shrimp Lethality Test*) untuk mengetahui adanya aktivitas sitotoksik, (Rahayu *et al.*, 2013). Metode ini ditujukan terhadap tingkat mortalitas larva udang *Artemia salina* L. yang disebabkan oleh ekstrak uji. Kematian larva memiliki hubungan yang konsisten dengan toksisitas ekstrak uji (Cahyadi, 2009). Ahad *et al.*, (2011) dan Ansar *et al.*, (2014) menyatakan bahwa ekstrak etanol tanaman *Pistia stratiotes* L memiliki LC₅₀ sebesar 60µg/mL, sedangkan pada ekstrak PE diperoleh LC₅₀ sebesar 45µg/mL. Perbedaan nilai LC₅₀ tersebut diduga disebabkan karena senyawa flavonoid larut didalam pelarut kurang polar sedangkan beberapa literatur menunjukkan bahwa senyawa flavonoid larut dalam pelarut polar.

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik hasil ekstraksi senyawa flavonoid pada daun kayu apu dengan pelarut metanol dan PE selanjutnya dipartisi dengan n-heksan dan etil asetat untuk mengoptimisasi ekstraksi flavonoid untuk mengeksplorasi kemampuan aktivitas sitotoksik menggunakan metode *BSLT* (*Brine Shrimp Lethality Test*).

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan meliputi *soxhlet apparatus*, loyang, *blender*, neraca analitik, peralatan gelas, corong pisah, klem, statif, *rotary vacuum evaporator*, seperangkat aquarium dan *aerator*, vial, lup, pipet volum, bola hisap, labu ukur. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun kayu apu (*Pistia folium*) yang diperoleh dari Malang. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah: PE teknis, etil asetat teknis, n-heksan teknis, metanol (teknis dan p.a), kloroform (p.a), plat KLT, silika gel GF254, ragi, aquades, air laut, telur *Artemia salina* L, etanol 96%, HCl 2M, pita Mg, sitroborat, Pb asetat 10%, pereaksi Lieberman-Bourchard dan pereaksi Dragendorf.

Jalannya penelitian

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman kayu apu (*Pistia folium*) dilakukan di UPT Materia Medika Batu.

Ekstraksi daun kayu apu

Sebanyak 30g serbuk kering daun kayu apu disokletasi dengan pelarut (PE) dan metanol sebanyak 500mL. Hasil ekstraksi dievaporasi dengan *rotary vacuum evaporator* sampai menjadi ekstrak pekat. Ekstrak pekat dipartisi berturut-turut dengan n-heksan (1:1) dan etil asetat (1:1) Hasil partisi etil asetat dievaporasi hingga diperoleh ekstrak pekat.

Penetapan rendemen dan bobot jenis

Rendemen ekstrak ditentukan dari bobot ekstrak hasil sokletasi dan ekstrak hasil partisi etil asetat. Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 5% dan 10% dalam pelarut masing-masing (PE dan metanol) dengan piknometer. Piknometer dikalibrasi dengan cara menetapkan piknometer dan bobot air pada suhu 25°C. Bobot jenis ekstrak diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air dalam piknometer pada suhu 25°C.

Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap ekstrak hasil sokletasi pelarut PE dan metanol, hasil partisi n-heksan dan hasil partisi etil asetat.

Identifikasi golongan flavonoid. Uji HCl dan Mg: Larutan sampel ditambahkan larutan HCl dan serbuk Mg; Uji Sitroborat: Larutan sampel ditambah 5tetes larutan sitroborat; Uji Pb-asetat: Larutan sampel ditambahkan larutan timbal asetat 10%

Identifikasi tanin: Larutan sampel ditambah aquades panas, didihkan dan disaring. Filtrat ditambahkan larutan gelatin 10%. Identifikasi saponin: larutan sampel ditambah aquades panas dan dikocok. Identifikasi alkaloid: Larutan sampel ditambah HCl 2N dan aquades; dipanaskan dan disaring, selanjutnya filtrat ditambah 3 tetes pereaksi Dragendorf; Identifikasi triterpenoid dan sterol: Larutan sampel ditambah reagen Libermann-Burchard.

Analisis KLT identifikasi flavonoid

Ekstrak pekat hasil partisi etil asetat dilarutkan kembali dengan metanol dan PE sebagai sampel KLT. Sampel ditotolkan pada plat silika gel GF254. Fase gerak yang digunakan kloroform: metanol 3:1 dengan pereaksi penampak sitroborat. Noda pada plat diamati pada cahaya tampak dan sinar UV 256 nm.

Uji sitotoksik metode BSLT

Uji sitotoksitas dengan larva *Artemia salina* L. dengan metode Meyer (1982).

Penetasan dilakukan dengan cara merendam 1g telur *Artemia salina* L dalam air laut

sebanyak 2L dalam aquarium. Aquarium diberi penerangan dengan lampu pijar 40-60watt dan diaerasi selama 48 jam. Sampel ekstrak uji masing-masing dibuat menjadi 5 konsentrasi yaitu 20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL, 80µg/mL dan 100µg/mL dengan cara pengenceran. 10 ekor larva dimasukkan kedalam vial dan ditambahkan 1 tetes suspensi ragi. Selanjutnya ditambahkan air laut sampai 10mL. Konsentrasi 0µg/mL dibuat sebagai kontrol tanpa penambahan ekstrak. Pengamatan *Artemia salina* dilakukan setelah 24 jam dengan menghitung jumlah kematiannya. Uji BSLT dilakukan dengan 3 kali ulangan sehingga diperoleh persentase kematian, kemudian diolah dengan regresi linier untuk memperoleh LC₅₀ (*Lethal Concentration 50*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi tanaman yang dilakukan di UPT Materia Medika Batu menunjukkan bahwa kunci determinasi yang diperoleh adalah 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10-b11-b-12b-13a-1a-1.

Spesifikasi ekstrak yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki rendemen lebih tinggi dibandingkan ekstrak PE. Hasil perhitungan rendemen, bobot jenis dan pengamatan organoleptis ekstrak, seperti disajikan pada Tabel I.

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak hasil partisi etil asetat menunjukkan adanya senyawa flavonoid dan beberapa senyawa metabolit sekunder, seperti disajikan pada Tabel II. Hasil analisis KLT menunjukkan senyawa golongan flavonoid terdeteksi pada kedua ekstrak (PE dan metanol) hasil partisi. Warna dan nilai Rf bercak disajikan pada Gambar 1.

Aktivitas sitotoksik ekstrak kayu apu hasil partisi ditentukan dari prosentase kematian *Artemia salina L.* pada masing-masing konsentrasi ekstrak. Selanjutnya data prosentase kematian diolah menggunakan persamaan regresi linier $y = bx + a$, antara konsentrasi (x) dengan persen kematian (y) untuk menentukan nilai LC₅₀, seperti disajikan pada Gambar 2.

Dalam penelitian ini, rendemen, skrining fitokimia dan analisis KLT menunjukkan bahwa dalam daun kayu apu (*Pistiae folium*) terdapat senyawa golongan flavonoid dan beberapa senyawa metabolit sekunder yang lain. Rendemen ekstrak methanol lebih banyak dibandingkan ekstrak petroleum eter (PE). Hal ini mengindikasikan bahwa kandungan senyawa metabolit sekunder dalam daun kayu apu lebih banyak cenderung bersifat polar.

Hasil skrining fitokimia dan KLT membuktikan adanya senyawa golongan flavonoid, saponin dan steroid. Senyawa flavonoid

yang terdeteksi pada ekstrak PE hasil partisi diduga adalah senyawa flavonoid golongan non polar seperti isoflavon. Flavonoid jenis ini larut dalam pelarut semi polar seperti kloroform, eter, diklorometan, dietil eter dan etil asetat (Pinho, 2012, Aqnes *et al.*, 2014). Senyawa flavonoid yang terdeteksi pada ekstrak metanol hasil partisi diduga adalah senyawa flavonoid flavonol dan flavonon (Bhandary *et al.*, 2012).

Kromatogram KLT menunjukkan bahwa kedua ekstrak yakni PE dan metanol mengandung senyawa flavonoid karena memiliki nilai Rf dan warna bercak yang hampir sama. Menurut Sjahid (2008), bercak yang tampak pada panjang gelombang 254 nm merupakan senyawa yang mempunyai ikatan rangkap berkonjugasi diantaranya flavonoid, steroid, terpenoid dan lain sebagainya. Bercak yang terbentuk diduga karena flavonoid membentuk ikatan dengan campuran asam borat dan asam sitrat dalam pereaksi sitroborat.

Senyawa flavonoid diduga terdeteksi pada Rf 0,66 (ekstrak metanol) dan Rf 0,571 (ekstrak PE). Warna ungu yang diberikan pada kromatogram berbeda dengan literatur. Arifin *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa bercak flavonoid akan berfluorosensi kuning pada UV356 nm. Perbedaan warna bercak tersebut disebabkan karena bercak diamati pada sinar UV pada gelombang yang berbeda.

Berdasarkan data diatas (Gambar 2), maka diketahui ekstrak metanol dan PE tergolong toksik karena nilai LC₅₀ <1000ppm (Prasetyori ni *et al.* 2011) dan berkisar pada rentang 30-100µg/mL. Kedua ekstrak hasil partisi kemungkinan memiliki potensi sebagai antibakteri, karena nilai LC₅₀ keduanya masuk pada rentang 30-200ppm. Ekstrak metanol hasil partisi diketahui lebih toksik dan lebih efektif dari pada ekstrak PE dengan nilai LC₅₀ 51,7608µg/mL.

Penelitian ini membuktikan adanya terjadi peningkatan aktivitas sitotoksik pada ekstrak yang dipartisi dengan etil asetat. Penelitian sebelumnya, Ansar *et al.* (2014) dan Ahad *et al.* (2011) menyebutkan bahwa ekstrak metanol tanpa dipartisi memiliki nilai LC₅₀ sebesar 121.99µg/mL dan 60µg/mL. Proses partisi dapat menyari senyawa golongan flavonoid dalam ekstrak metanol secara maksimal.

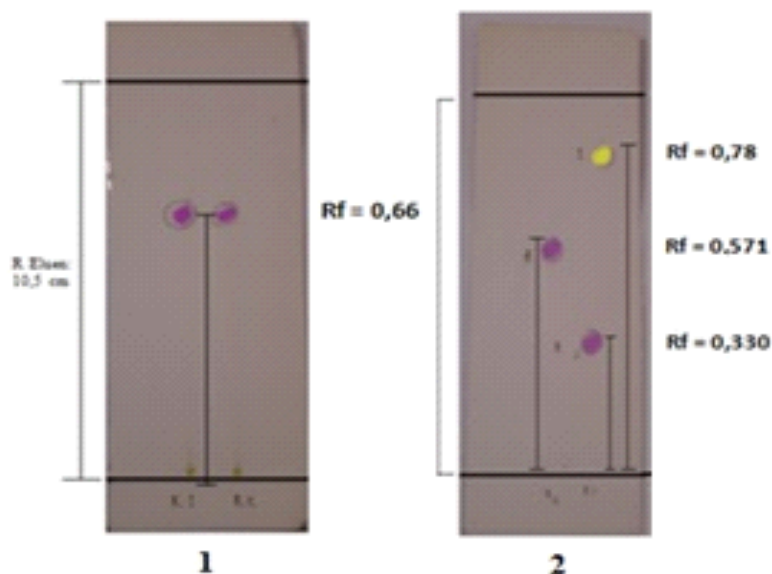
Beberapa kemungkinan perbedaan nilai LC₅₀ pada penelitian ini dengan penelitian sebelumnya yaitu perbedaan lokasi, kondisi lingkungan, fisikokimia dan biologis tanaman kayu apu sehingga mempengaruhi jumlah dan jenis senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan (Setyati *et al.*, 2005).

Tabel I. Hasil rendemen, organoleptis dan bobot jenis ekstrak

Spesifikasi	Ekstrak PE	Ekstrak Metanol
Rendemen hasil sokletasi	7,096%	13,01%
Rendemen hasil partisi	0,69%	6,25%
Organoleptis :		
• Warna	Kuning Kehijauan	Hijau Kehitaman
• Bau	Khas PE	Khas Metanol
• Konsistensi	Semi Padat	Kental
Bobot Jenis Ekstrak (5%)	0,7373g/mL ± 0,0061	0,8170g/mL ± 0,0098
Bobot Jenis Ekstrak (10%)	0,7685g/mL ± 0,0101	0,8265g/mL ± 0,0131

Tabel II. Skrining fitokimia ekstrak hasil partisi etil asetat

Senyawa Dugaan	Reagen	Ekstrak Hasil Partisi Etil Asetat	
		Pelarut PE	Pelarut Metanol
Flavonoid	+ HCl+ Mg	(+) Hijau	(+) Merah Bata
	+ Sitroborat	(-)	(+) Kuning Keruh
	+ Pb Asetat	(+) Endapan Kuning	(+) Kuning Keruh
Saponin	+ Uji Forth	(-)	(+) Berbusa
Steroid	+ Lieberman-Bourchard	(+) Larutan Hijau Kebiruan	(-)

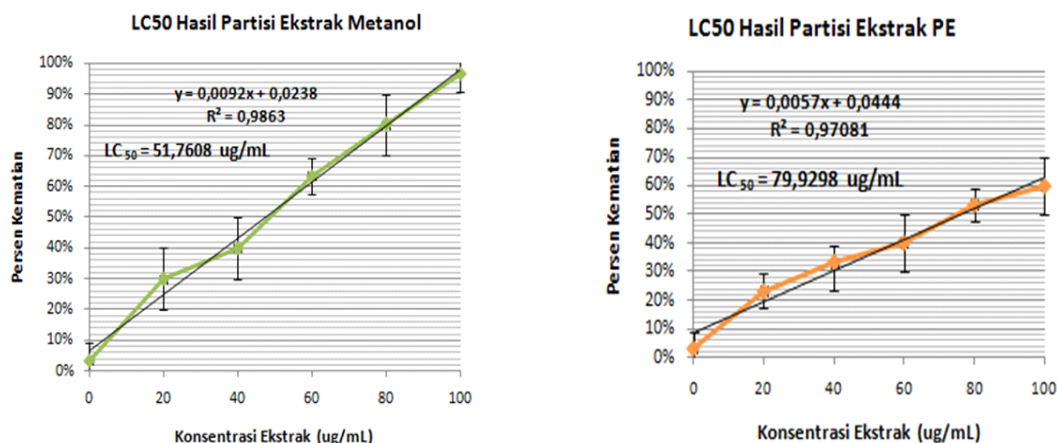


Gambar 1. Profil kromatogram analisis KLT ekstrak petroleum eter dan metanol daun kayu apu hasil partisi

Keterangan 1. Hasil KLT identifikasi flavonoid ekstrak metanol hasil pada sinar UV 254nm dengan pereaksi penampak sitoborat; 2. Hasil KLT identifikasi flavonoid ekstrak Petroleum Eter (PE) hasil pada sinar UV 254nm dengan pereaksi penampak sitoborat;

Kedua, komponen senyawa metabolit sekunder khususnya flavonoid yang ada dalam daun kayu apu adalah senyawa yang cenderung bersifat polar sehingga tidak terekstrak maksimal pada pelarut PE tetapi lebih terekstrak pada pelarut metanol. Hal ini dapat dibuktikan dengan selisih rendemen ekstrak PE yang 5,552% jauh lebih rendah dari rendemen ekstrak metanol.

Derajat sitotoksik ekstrak terhadap *Artemia salina* L. dapat dikaitkan dengan kandungan senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak yakni senyawa flavonoid dan beberapa senyawa lain yang teridentifikasi pada skrining fitokimia dan KLT. Berdasarkan hal tersebut, efek toksisitas bisa disebabkan karena efek sinergis dari senyawa-senyawa yang terekstrak, sehingga



Gambar 2. Grafik regresi linier antara konsentrasi ekstrak dan persen kematian

aktivitas sitotoksik menjadi lebih tinggi ataupun lebih rendah.

Secara umum, mekanisme kematian larva diperkirakan karena senyawa-senyawa tersebut bekerja dengan menghambat daya makan larva (*antifeedant*) dan bertindak sebagai racun perut (*stomach poisoning*).

Hal ini akan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva dan mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa, sehingga larva tidak mampu mengenali makanannya dan larva mati karena sistem pencernaannya terganggu (Cahyadi, 2009).

KESIMPULAN

Ekstrak PE daun kayu apu (*Pistia folium*) hasil partisi diduga mengandung senyawa flavonoid dan steroid, dengan nilai LC₅₀ 79,9298µg/mL dan ekstrak metanol hasil partisi diduga mengandung senyawa flavonoid dan saponin, dengan nilai LC₅₀ 51,7608µg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Materia Medica Batu (MMB) dan Laboratorium Kimia Organik Universitas Brawijaya Malang yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Ahad, KAA., Prasanta P., Islam Md. T., Biswas NN., Sadhu SK., 2011. *Cytotoxicity, Antimicrobial and Neuropharmacological Evaluation of Ethanolic Extract of Pistia Stratiotes L.* *Int. Res. J. Pharm.*, 2(2): 82-92.

Ansar SU., Manikantam SV., 2014. *Estimations Of Pistia Stratiotes L . By Using*

Chromatographic Methods. J. Bio. Biotech., 4(4): 2-6.

- Aqnes, B., Ulfah, M., Oktania, FA., 2014. *Aktivitas Antioksidan Fraksi Kloroform Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annona Muricata L.) Dan Identifikasi Kandungan Senyawa Kimianya.* Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim. Prosiding SNST Ke-5: 1-6.
- Arifin, Helmi, Nelvi A., Dian H., Roslinda R., 2006. *Standarisasi Ekstrak Etanol Daun Eugenia Cumini Merr. J. Sains Tek. Far.*, 11: 88-93.
- Asih, Astiti I.A.R dan Setiawan, I.M.A., 2008. *Senyawa Golongan Flavonoid pada Ekstrak N-Butanol Kulit Batang Bungur (Lagerstroemia Speciosa Pers.).* *Jurnal Kimia* 2, 2: 111-116.
- Bhandary, Satheesh K., Suchetha KN., Vadisha SB., Sharmila KP., Mahesh PB., 2012. *Preliminary Phytochemical Screening of Various Extracts of Punica Granatum Peel, Whole Fruit and Seeds.* *Nitte University J. Health. Sci. Ori.*, 2(4): 34-38.
- Cahyadi dan Robby, 2009. *Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Buah Pare (Momordica Charantia L.) terhadap Larva Artemia Salina Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Bst).* Skripsi. Universitas Diponegoro Semarang.
- Gustina, Nyi Mas Rosmeini Anica. 2012. *Aktivitas Ekstrak, Fraksi Pelarut, dan Senyawa Flavonoid Daun Sukun (Artocarpus Altilis) terhadap Enzim A -Glukosidase Sebagai Antidiabetes.* Skripsi. Institut Pertanian Bogor
- Hermawati, Ervina, 2005. *Fitoremediasi Limbah Detergen Menggunakan Kayu Apu (Pistia Stratiotes L.) dan Genjer (Limnocharis Flava L.).* *Biosmart*, 7(1980): 115-124.

- Karim, Mohammed F., Hasan I., Nizam U., Nirmala P., Tahmina H., Md. Moklesur RS., Md. Sohel R. 2014. *Phytochemical And Pharmacological Investigations of Pistia Stratiotes L.* Int. J. Innovative Pharm. Sci. Res., 2(640): 640-652.
- Musir, A., Farida Y., Martati T., Edward B. 2009. *Penapisan Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana dan Metanol daun Keladi (Typhonium divaricatum (L) Decne).* Seminar Nasional ISFI, (L), pp.7-9.
- Pinho, P., 2012. *Solubility of Flavonoids in Pure Solvents.* Industrial & Engineering Chemistry Research.
- Prasetyorini, Wiendarlina IY., Peron, AB., 2011. *Toksisitas Beberapa Ekstrak Rimpang Cabang Temulawak (Curcumanthorrhiza Roxb.) pada Larva Udang (Artemiasalina Leach.).* Fitofarmaka, 1(2): 14-21.
- Tyagi TR., Agarwal MH., 2014. *Aquatic Plants Pistia Stratiotes L. and Eichhornia Crassipes (Mart.) Solms: An Sustainable Ecofriendly Bioresources - A Review.* International Journal For Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS), 3(1-2): 540-550.
- Rahayu, MR., Sibarani, J., Swantara, IMD., 2013. *Callyspongia Aerizusa terhadap Larva Artemia Salina L.* Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry), 1(1): 1-7.
- Setyati, WA., Subagiyo dan Ridlo A. 2005. *Potensi Bioaktivitas Alkaloid dari Lamun (Seagrass) Enhalus acoroides (L.F) Royle.* [Laporan Kegiatan]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro. Semarang
- Sjahid dan Rahmawan L., 2008. *Isolasi Dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (Eugenia Uniflora L.),* 22.
- Widyawati, PS. Wijaya CH., Harjosworo PS., Sajuthi D. 2010. *Pengaruh Ekstraksi dan Fraksinasi Terhadap Kemampuan Menangkap Radikal Bebas DPPH (1,1-Difenil-2- Pikril Hidrazil) Ekstrak dan Fraksi Daun Beluntas (Pluchea indica Less).* Seminar Rekayasa Kimia dan Proses 201, pp.1-7.
- Wirdani, PNM., 2008. *Konsentrasi Flavonoid dan Lethal Concentration 50 (LC50) Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum).* Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Institut Pertanian Bogor.
- Wirawan, Wiweka A., Ruslan W., Liliya DS. 2014. *Pengolahan Limbah Cair Domestik Menggunakan Tanaman Kayu Apu (Pistia Stratiotes L.) dengan Teknik Tanam Hidroponik Sistem DFT (Deep Flow Technique).* Jurnal Sumberdaya Alam Dan Lingkungan, 1, 63-70.