

Pengujian antibakteri dan antioksidan ekstrak kulit batang siuri (*Koordersiodendron pinnatum* (Blanco) Merr.)

Antibacterial and antioxidative activity tests on extract of siuri (*Koordersiodendron pinnatum* (Blanco) Merr.) cortex

Praptiwi dan Mindarti Harapini

Bidang Botani, Puslit Biologi-LIPI

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antioksidan secara *in-vitro* ekstrak kulit batang siuri (*Koordersiodendron pinnatum*). Uji antibakteri dilakukan pada ekstrak alkohol, heksana, kloroform dan etil asetat pada 7 isolat bakteri yaitu 4 isolat Gram Positif (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* sp.) dan 3 isolat Gram Negatif (*Salmonella enteritidis*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Masing-masing ekstrak dilarutkan dengan DMSO pada konsentrasi 50, 25, 12,5 dan 6,75% dengan 3 kali ulangan. Media yang digunakan adalah Mueller Hinton Agar (MHA). Uji antioksidan secara *in-vitro* dilakukan pada konsentrasi : 1% (E1), 5% (E2), dan 10% (E3) dengan kontrol negatif aquadest (K-) dan kontrol positif α -tokoferol (K+). Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan 7 isolat bakteri yang diuji. Daya hambat ekstrak etil asetat pada 3 isolat bakteri Gram Negatif (*Corynebacterium* sp., *S. enteritidis* dan *E.coli*) lebih besar dari daya hambat 10 unit penisilin. Nilai peroksida (POV) ekstrak etanol (140,66) lebih kecil dari α -tokoferol dan meningkatnya konsentrasi ekstrak menurunkan nilai absorbansi.

Kata kunci : *Koordersiodendron pinnatum*, antibakteri, antioksidan.

Abstract

The aim of the study was to determine the *in-vitro* antibacterial and antioxidative activities of siuri (*Koordersiodendron pinnatum*) bark extract. Ethanolic, hexane, chloroform and ethyl acetate extracts were tested for antibacterial activity against 7 bacteria isolates which were 4 Gram Positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* sp.) and 3 Gram Negative bacteria (*Salmonella enteritidis*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Extract concentrations used were : 50, 25, 12.5 and 6.75%. The experiments were conducted in triplicate in Mueller Hinton Agar (MHA). Antioxidative test was performed at the concentration of 1, 5 and 10% with aquadest as a negative control and α -tocopherol as positive control. The results showed that the ethyl acetate extract inhibited the growth of 7 bacteria tested, and the growth inhibition area on Gram negative bacteria was wider than that of 10 units of penicillin. Peroxide value of ethanol extract (111.29) was lower than that of α -tocopherol. Increasing extract concentration reduced the absorbance value.

Key words : *Koordersiodendron pinnatum*, antibacteria, antioxidant.

Pendahuluan

Siuri (*Koordersiodendron pinnatum*) merupakan pohon dengan tinggi mencapai 50 m, diameter batang 2 m dan umumnya terdapat pada ketinggian 450 m dpl (Heyne, 1987), dan merupakan salah satu tumbuhan dari suku Anacardiaceae yang tersebar di Filipina, Kalimantan bagian utara, Sulawesi, Maluku dan Papua bagian utara (Boer *et al.*, 1995).

Pemanfaatan siuri yang telah dikenal masyarakat adalah sebagai bahan bangunan (kayunya), sedangkan kulit batang yang ditumbuk digunakan untuk memberi warna gelap pada gula aren (Heyne, 1987). Boer *et al.* (1995) menyatakan bahwa kayu siuri dapat digunakan sebagai bahan lantai rumah karena memiliki warna merah tua yang rata. Pemanfaatan siuri sebagai bahan obat belum banyak dikenal meskipun siuri merupakan salah satu tumbuhan dari suku Anacardiaceae. Selanjutnya Boer *et al.* (1995) melaporkan bahwa getah dari kulit batang siuri digunakan sebagai bahan obat lokal, tanpa ada informasi tentang senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada kulit batang siuri. Kandungan kimia tersebut penting diketahui karena hal ini akan berkaitan dengan senyawa yang kemungkinan dapat bersifat bioaktif. *Bioesai* dapat juga digunakan untuk mengetahui sifat bioaktif dari ekstrak tanaman antara lain uji antibakteri. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa pada kulit batang siuri sedang uji antibakteri dilakukan pada bakteri Gram Positif dan Gram Negatif, selain itu dilakukan pula penentuan nilai peroksida dan uji antioksidan secara *in-vitro* ekstrak kulit batang siuri.

Metodologi

Bahan

Kulit batang siuri (*Koordersiodendron pinnatum*) diperoleh dari desa Pakuli, Kab. Donggala, Sulawesi Tengah. Kulit batang tersebut dicacah kemudian dikeringkan, dan selanjutnya digiling menjadi serbuk.

Penapisan Fitokimia (Cuilei, 1984)

Dua puluh lima gram serbuk kulit batang siuri diekstraksi dengan dietil eter, dikocok sampai hasil ekstraksi berwarna jernih. Sari eter yang ada dikumpulkan dan dipekatkan dengan rotavapor. Ekstrak eter yang telah dipekatkan dianalisis untuk identifikasi minyak atsiri, lemak dan asam lemak,

sterol dan triterpena, alkaloida basa, aglikon flavon dan aglikon antrasenosida. Ampasnya dikeringkan untuk diekstraksi dengan alkohol. Sari alkohol yang diperoleh dikumpulkan kemudian dipekatkan. Ekstrak alkohol yang telah pekat dianalisis untuk identifikasi tanin, gula pereduksi, dan garam alkaloida. Sedangkan terhadap sari alkohol yang dihidrolisis dilakukan analisis untuk identifikasi antrasenosida, glikosida steroida dan flavonoida. Selanjutnya, ampas dikeringkan. Ampas yang telah kering dilarutkan dengan air kemudian dilakukan ekstraksi dengan pelarut air. Ekstrak air yang telah dipekatkan digunakan untuk analisis identifikasi poliuronida, gula pereduksi, glukosida, tanin dan saponin. Identifikasi tanin dilakukan pada ekstrak alkohol dengan menambahkan 1-2 ml besi (III) klorida. Perubahan warna yang terjadi diamati. Warna biru kehitaman menunjukkan adanya tanin galat sedang warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin katekol. Kandungan flavonoida diidentifikasi dari ekstrak eter. Ekstrak eter diuapkan, residu yang ada ditambah 1-2 ml metanol kemudian dipanaskan pada suhu 50°C kemudian ditambahkan logam Mg dan 4-5 ml HCl. Warna merah menunjukkan adanya flavonol. Uji saponin dilakukan terhadap ekstrak air yang telah diencerkan kemudian dikocok selama 15 menit. Apabila terbentuk busa lebih besar atau sama dengan 1 cm dan tetap stabil setelah didiamkan 15 menit menunjukkan adanya saponin.

Ekstraksi

Satu kg serbuk kulit batang siuri diekstraksi dengan alkohol 80% sampai jernih. Ekstrak yang ada dikeringkan dengan rotavapor (Etanol I). Sebagian dari ekstrak alkohol tersebut dilarutkan dalam alkohol 50% dan pelarut heksana sebanyak 3-5 kali. Sehingga diperoleh ekstrak heksana. Bagian yang terlarut dalam alkohol selanjutnya ditambahkan pelarut kloroform sebanyak 3-5 kali dan dipisahkan dengan corong pemisah. Ekstrak kloroform ditampung dan dipekatkan. Bagian yang terlarut pada alkohol diekstrak kembali dengan etil asetat, dipisahkan dengan menggunakan corong pemisah. Ekstrak etil asetat ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan rotavapor. Berdasarkan hal tersebut maka diperoleh ekstrak alkohol (Etanol), ekstrak heksana, ekstrak kloroform dan ekstrak etil asetat yang akan digunakan untuk uji antibakteri.

Uji antibakteri

Uji antibakteri dilakukan pada ekstrak alkohol, ekstrak heksana, ekstrak kloroform dan ekstrak etil asetat dengan menggunakan bakteri Gram Negatif (*Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) dan Gram Positif

(*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* sp.). Isolat bakteri diperoleh dari koleksi biakan Balai Penelitian Veteriner, Bogor. Masing-masing ekstrak dilarutkan dengan DMSO pada konsentrasi 50%, 25%, 12.5% dan 6.75%. Masing-masing perlakuan mempunyai tiga ulangan. Lima belas mikroliter ekstrak diteteskan pada kertas cakram steril dan selanjutnya diletakkan pada permukaan media Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Media tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Simmons dan Craver, 1980). Pengamatan terhadap aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram. Kontrol negatif menggunakan DMSO tanpa ekstrak, sedangkan kontrol positif menggunakan antibiotika penisilin 10 unit.

Pengujian dan perhitungan nilai peroksida

Ekstrak etanol kulit batang siuri yang diekstrak langsung serta pembandingan positif (α -tokoferol) ditimbang masing-masing sebanyak \pm 500 mg, dimasukkan dalam labu erlenmeyer 250 ml kemudian tambahkan 30 ml campuran asam asetat dan kloroform dengan perbandingan 3 : 2, kocok sampai homogen. Tambahkan 0,5 ml KI dan 30 ml air, kocok sampai homogen, lalu dititrasi dengan perlahan menggunakan natrium tiosulfat 0,1 N sambil dikocok hingga berwarna kuning dan tambahkan 0,5 ml larutan kanji 1%. Titrasi dilanjutkan dengan pengocokan hingga warna biru yang terjadi tepat hilang (Williams, 1984). Dari hasil titrasi tersebut dicatat jumlah (dalam ml) natrium tiosulfat yang terpakai, dihitung normalitasnya. Nilai peroksida dihitung dengan menggunakan rumus :

$$POV = S \times N \times 1000 / \text{gram sampel.}$$

S : ml natrium tiosulfat; N: normalitas dari natrium tiosulfat

Pengujian antioksidan secara *in-vitro*

Ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam etanol 75%. Konsentrasi larutan yang diuji adalah 1, 5 dan 10%. Empat ml larutan sampel dari masing-masing konsentrasi dimasukkan dalam vial 25 ml ditambah 4.1 ml asam linoleat 2.51% dalam etanol 96 %, 8 ml buffer fosfat 0.05 ml, dan 3.9 ml air suling. Botol vial ditutup rapat dan dimasukkan dalam oven pada suhu 40°C dan didiamkan selama 24 jam. Selanjutnya dari masing-masing vial diambil 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah 9.7 ml etanol 75%, 0.1 ml amonium tiosianida 30%. Larutan dikocok sampai homogen dan didiamkan selama 3 menit. Kemudian tambahkan 0.1 ml ferro klorida 0.02 ml M dalam HCl 3.5%

dan dikocok kembali sampai homogen. Daya serap warna merah yang terjadi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500 nm. Pengamatan dilakukan selama 14 hari secara *triplo* (Kikuzaki *et al.*, 1999 dan Kikuzaki *et al.*, 2000).

Pembuatan kontrol positif dan negatif

α -tokoferol digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 10%. Satu gram α -tokoferol dilarutkan dalam 10 ml etanol 75% kemudian diambil 4 ml dengan menggunakan jarum suntik volume 5 ml. Masukkan dalam botol vial yang volumenya 25 ml, setelah itu tambahkan 4,1 ml asam linoleat 2,51% dalam etanol 96%, 8 ml buffer fosfat 0,05 M dan 3,9 ml air suling. Botol vial ditutup dan dimasukkan dalam oven pada suhu 40°C, didiamkan selama 24 jam. Pembuatan kontrol negatif sama dengan pembuatan kontrol positif tetapi tanpa penambahan α -tokoferol (Kikuzaki *et al.*, 1999).

Hasil Dan Pembahasan

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia kulit batang siuri dengan menggunakan ekstrak eter, alkohol, alkohol terhidrolisis dan air bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terdapat pada kulit batang siuri (tabel I). Pelarut yang digunakan mempunyai tingkat kepolaran yang berbeda karena suatu senyawa hanya dapat larut pada pelarut yang mempunyai kepolaran yang sama (Kochhar dan Russel, 1990).

Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa kulit batang siuri mengandung senyawa-senyawa seperti tanin, garam alkaloida dan flavonoida yang kemungkinan bersifat bioaktif. Menurut Tyler *et al.* (1988) tanin yang bersifat 'astringent' dapat digunakan sebagai obat hemoroid sedangkan senyawa antrasenosida yang bersifat sebagai pencahar dapat digunakan untuk memperbaiki gejala konstipasi. Senyawa-senyawa lain yang terdapat pada kulit batang siuri tersebut masih perlu diuji secara biosai untuk mengetahui apabila terdapat senyawa yang bersifat bioaktif.

Uji Antibakteri

Ekstrak alkohol, heksana, kloroform dan etil asetat kulit batang siuri diuji antibakterinya secara *in-vitro* dengan menggunakan bakteri Gram negatif (*Salmonella enteritidis*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) dan Gram positif

(*Staphylococna aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* sp.) dengan konsentrasi 50%, 25%, 12.5% dan 6.25%. Hasil uji antibakteri ekstrak kulit batang siuri terdapat pada tabel II.

Uji antibakteri menunjukkan bahwa bakteri yang paling sensitif terhadap ekstrak kulit batang siuri adalah *S. epidermidis* meskipun daya antibakterinya masih lebih kecil dari daya antibakteri 10 unit penisilin. Hasil pada tabel II juga menunjukkan bahwa meningkatnya konsentrasi ekstrak juga meningkatkan daya hambat pertumbuhan bakteri. Hal ini berkaitan dengan konsentrasi senyawa yang terlarut pada ekstrak, meningkatnya konsentrasi ekstrak berarti konsentrasi senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri juga meningkat. tabel II. juga menunjukkan bahwa senyawa-senyawa semipolar yang terlarut pada ekstrak kloroform dan etil asetat mempunyai daya hambat terhadap 7 isolat bakteri yang diuji, sedangkan ekstrak heksana yang mengandung senyawa non-polar hanya dapat menghambat 2 isolat bakteri. Sifat antibakteri ekstrak etil asetat berkaitan pula dengan jenis senyawa yang terlarut. Menurut Cuilei (1984) ekstrak etil asetat mengandung senyawa flavonoida, lignan dan triterpenoida. Flavonoida telah dipakai dalam pengobatan tradisional (Robinson, 1991). Selanjutnya Robinson (1991) menyatakan bahwa flavonoida dapat menghambat fosfodiesterase, protein kinase dan DNA polimerase. Selain flavonoida

yang kemungkinan bersifat bioaktif maka triterpenoida pada ekstrak etil setat telah diketahui sebagai komponen aktif pada tumbuhan obat. Menurut Robinson (1991) beberapa triterpenoida telah digunakan untuk penyakit diabetes, gangguan menstruasi dan kerusakan hati. Daya kerja antibakteri pada ekstrak etil asetat kemungkinan melalui penghambatan sintesis asam nukleat karena flavonoida dapat menghambat DNA polimerase (Robinson, 1991). Berdasarkan hasil tersebut maka terdapat kemungkinan bahwa senyawa yang bersifat antibakteri bersifat semipolar.

Aktivitas antibakteri ekstrak kulit batang siuri pada bakteri Gram Positif pada umumnya lebih besar daripada aktivitas antibakteri Gram Negatif. Hal ini kemungkinan disebabkan dinding sel pada bakteri Gram Negatif lebih kompleks daripada dinding sel Gram Positif (Jawetz *et al.*, 1996) sehingga senyawa yang bersifat antibakteri lebih sukar untuk menembus dinding sel bakteri Gram Negatif.

Nilai peroksida (POV) dan uji antioksidan

Hasil POV menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang siuri mempunyai nilai POV lebih kecil (111,29) dibandingkan α -tokoferol (212,52) (tabel III.). Menurunnya nilai peroksida berarti meningkatnya aktivitas antioksidan. Berdasarkan hasil uji tersebut dapat disimpulkan bahwa kulit batang siuri mempunyai aktivitas sebagai antioksidan lebih

Tabel I. Senyawa kimia pada kulit batang siuri (*Koordersiodendron pinnatum*) berdasarkan penapisan fitokimia

Uji	Ada	Tidak ada
Minyak atsiri		-
Lemak dan asam lemak tinggi		-
Sterol dan triterpenoida		-
Alkaloida basa		-
Aglikon flavonoida		-
Aglikon antrasenosida	+	
Tanin	+	
Gula pereduksi	+	
Garam alkaloida	+	
Antrasenosida	+	
Glikosida steroida	+	
Flavonoida	+	
Poliuronida	+	
Saponin	+	

Tabel II. Uji antibakteri ekstrak kulit batang siuri terhadap 7 isolat bakteri

Bakteri/ Kons. ekstrak	Diameter Daerah Hambat (DDH) (mm)					
	Alkohol 80%	Heksan	Khloroform	E asetat	Kontrol +	Kontrol -
<i>S. aureus</i> -50%	19.0	9.0	8.0	19.0	35.0	-
-25%	17.0	-	8.0	18.0		
-12.5%	15.0	-	8.0	15.0		
-6.25%	13.5	-	-	12,0		
<i>S. epidermidis</i> -50%	20,0	14.0	12.5	24.0	35.0	-
-25%	20.0	12.0	10.0	22.5		
-12.5%	17.0	10.0	8.0	20.5		
-6.25%	15.0	0	0	19.5		
<i>S. agalactiae</i> -50%	-	8.0	14.5	15.0	20.0	-
-25%	-	-	14.5	14.0		
-12.5%	-	-	10.0	13.0		
-6.25%	-	-	0	-		
<i>Corynebacterium</i> sp. -50%	-	-	20.0	17.5	10.0	-
-25%	-	-	18.0	17.0		
-12.5%	-	-	13.5	17.0		
-6.25%	-	-	0	0		
<i>S. enteritidis</i> -50%	16.0	15.0	20.0	13.0	10.0	-
-25%	16.0	13.0	13.0	12.0		
-12.5%	12.0	13.0	11.5	10.0		
-6.25%	12.0	12.5	0	9.0		
<i>E.coli</i> -50%	-	-	13.0	13.0	-	-
-25%	-	-	12.0	12.0		
-12.5%	-	-	10.0	10.0		
-6.25%	-	-	0	9.0		
<i>P.aeruginosa</i> -50%	17.5	0	8.0	19.0	-	-
-25%	17.0	0	8.0	15.0		
-12.5%	17.0	0	0	14.5		
-6.25%	15.0	0	0	14.0		

Keterangan : kontrol + = penisilin 10 unit, kontrol - = DMSO

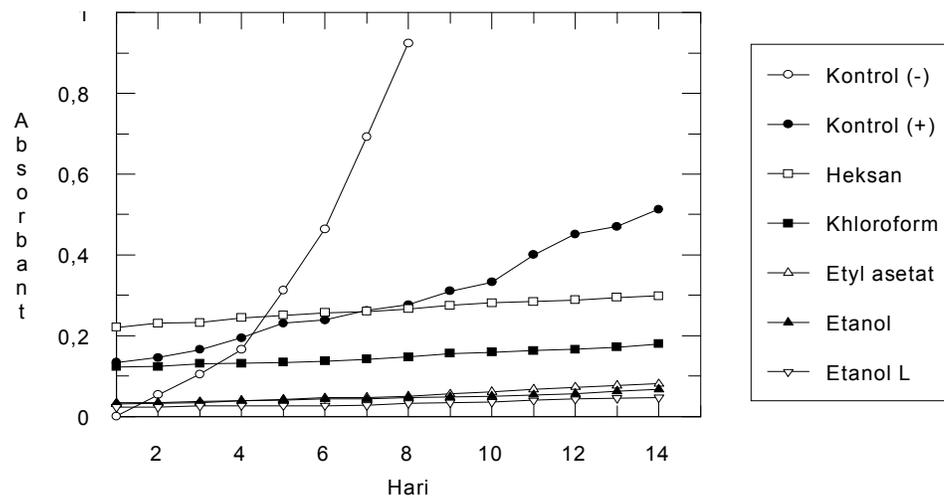
besar dari kontrol positif. Hal ini berkaitan dengan kandungan zat yang bersifat antioksidan pada kulit batang siuri, misalnya terdapatnya senyawa fenolik (tannin, flavonoida) (Boer *et al.*, 1995).

Pada penelitian ini, bahan diekstraksi secara bertingkat menggunakan pelarut organik dengan tingkat polaritas berbeda diawali dari pelarut non polar (heksana), semi polar (kloroform, etil asetat) dan pelarut polar (etanol). Hal ini disebabkan karena kandungan kimia dari suatu tanaman hanya dapat terlarut pada pelarut yang sama sifat kepolarannya, sehingga suatu golongan zat dapat dipisahkan dari zat yang lainnya (Kochhar dan Russel, 1990). Berdasarkan nilai rata-rata absorbansi ekstrak kulit batang siuri pada pelarut etanol

diperoleh nilai absorbansi yang terkecil adalah pada konsentrasi 10 %. Ekstrak etanol memperlihatkan absorbansi berturut – turut sebesar 0,128, 0,104 dan 0,047 pada masing– masing konsentrasi 1, 5 dan 10 %. Jadi, aktivitas antioksidan lebih baik pada konsentrasi 10% dibandingkan dengan konsentrasi 1 dan 5%. Menurut Kochhar dan Russel (1990) aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh jenis senyawa dan banyaknya zat antioksidan yang terlarut dalam masing-masing pelarut. Berdasarkan nilai rata-rata absorbansi ekstrak pada konsentrasi 10% ternyata aktivitas antioksidan yang lebih baik adalah pada ekstrak etanol dibandingkan dengan ekstrak yang lain karena nilai absorbansi pada ekstrak etanol lebih kecil daripada ekstrak lainnya (Gambar 1.). Hal ini dimungkinkan

Tabel III. Nilai rata-rata POV ekstrak etanol kulit batang siuri dan Vit. E (kontrol +)

	Na ₂ S ₂ O ₃ (ml)	N (Na ₂ S ₂ O ₃)	Ekstrak (g)	POV
α-tokoferol (Vit. E) 500 mg	1.20	0.0998	0.537	223.02
	1.30	0.0998	0.608	213.39
	1.10	0.0998	0.545	201.43
Rata-rata				212.61
Ekstrak etanol 500 mg	0.64	0.0998	0.568	112.45
	0.60	0.0998	0.539	111.09
	0.65	0.0998	0.588	110.32
Rata-rata				111.29



Gambar 1. Aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang siuri dengan pelarut heksan, khloroform, etil asetat, etanol, etanol L (langsung pada konsentrasi 10%).

karena senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan banyak yang bersifat polar seperti senyawa fenol, vitamin C dan karoten, sehingga lebih banyak larut dalam pelarut polar (etanol).

Kesimpulan

S. epidermidis merupakan bakteri yang pertumbuhannya dapat dihambat oleh 4 jenis ekstrak (ekstrak alkohol, heksana, khloroform dan etil asetat) dan merupakan bakteri yang sensitif dibandingkan isolat bakteri uji lain yang

digunakan pada penelitian meskipun belum diketahui perbedaannya secara nyata. Ekstrak etil asetat merupakan ekstrak yang mempunyai daya hambat terhadap 7 isolat bakteri yang diuji. Daya hambat ekstrak etil asetat pada 3 isolat bakteri Gram Negatif (*Corynebacterium* sp., *S. enteritidis* dan *E.coli*) lebih besar dari daya hambat 10 unit penisilin. Nilai peroksida (POV) ekstrak etanol (140,66) lebih kecil dari α-tokoferol dan meningkatnya konsentrasi ekstrak menurunkan nilai absorbansi.

Daftar Pustaka

- Boer, E., J.W. Hidebrand, D.S. Alonzo and J.M. Fundter. 1995. Koordersiodendron Engl. In : *Timber Trees : Minor Commercial Timbers*. Ed : R.H.M.J. Lemmens, Soerianegara and W.C. Wong.
- Cuilei, J. 1984. *Methodology for Analysis of Vegetables and Drugs*. Fac, of Pharmacy. Bucharest, Rumania

- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Balitbang Kehutanan, Departemen Kehutanan. Jakarta.
- Jawetz, E., J. Melnick and E. Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kikuzaki H, Sanae H., Yayoi K., and Nobuji N. 1999. Antioxidative phenylpropanoids from berries of *Pimenta dioica*. *J. of Phytochemistry* 52: 1307-1312.
- Kikuzaki H., Akemi s., Yoko M., and Nobuji N. 2000. Galloylglucosides from berries of *Pimenta dioica*. *J. of Natural Products* 63: 749-752.
- Kochhar, S.P. and J.B. Russel. 1990. Detection, Estimation and Evaluation of Antioxidants in Food System. In : *Food Antioxidant*. Elsevier Applied Science. London.
- Robinson, T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerbit ITB. Bandung.
- Simmons, C.G. and J. Craver. 1980. *Antibiotic sensitivity test using the disk method*. Australian Beureau Animal Health. Brisbane.
- Tyler, V.E., L.R. Brady and J.E. Robbers. 1988. *Pharmacognosy* 9th ed. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Williams S. 1984. *Official Methods of Analysis* 14th ed. Association of Official Analytical Chemist AOAC). Airlington, Virginia.