

Larvacidal Effect of Ethanol Extract of Sambiloto Leaves (*Andrographis Paniculata*) on The Death of *Aedes Aegypti* Larvae in Vitro

¹Alia Salma Nour Fathia, ²Dadi S Argadireja, ³Ismawati

¹Prodi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung,

²Bagian Ilmu Kesehatan Masyarakat, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung,

³Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung

Abstract. Dengue hemorrhagic fever can be found in tropical and subtropical countries, one of which is Indonesia, and until now it is still the main public health problem. *Aedes aegypti* is the vector of dengue hemorrhagic fever. One of the ways to prevent it is to control the vector biologically using natural ingredients from plants. Sambiloto leaves are known to have a variety of effects, including anti-oxidants, anti-pyretics, and larvicides. The purpose of this study was to analyze the effect of ethanol extract of sambiloto leaves on the mortality of the larvae of *Aedes aegypti* mosquito. This study was conducted by experimental method, used six concentrations of ethanol extract of sambiloto leaves that is 4,5 %, 5%, 7,5%, 10 %, 12,5% and 15%, control (-) and (+) and each concentrations are tested 3 times. This research was conducted based on the guidelines of WHOPEs 2005. The data analysis used for this study was the Kruskal-Wallis test to determine the effect of the concentrations on larval mortality and probit analysis to determine the lethal value concentration (LC₅₀). The result showed that there were a significant differences in the effect of the concentration of ethanol extract of sambiloto leaves, and the value of lethal concentration (LC)₅₀ of the ethanol extract of sambiloto leaves as larvicide of *Aedes aegypti* after 24 hours exposure is 10.205%. Conclusion, ethanol extract of sambiloto leaves has a killing power against *Aedes aegypti*.

Key Word: *Aedes aegypti*, extract ethanol, sambiloto leaves, larvicide

Efek Larvasida Ekstrak Etanol Daun Sambiloto (*Andrographis Paniculata*) terhadap Kematian Larva *Aedes Aegypti* Secara In Vitro

Abstrak. Demam Berdarah *Dengue* (DBD) ditemukan di negara beriklim tropis dan subtropis salah satunya di Indonesia, dan hingga saat ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat yang utama. *Aedes aegypti* merupakan vektor penyakit DBD. Salah satu cara untuk mencegah penyakit DBD ialah dengan pengendalian vektor secara hayati menggunakan bahan alami yang berasal dari tumbuhan. Daun sambiloto terkenal memiliki berbagai efek, antara lain sebagai anti oksidan, anti piretik, dan sebagai larvasida. Tujuan penelitian untuk mengetahui efek larvasida ekstrak etanol daun sambiloto terhadap kematian larva *Aedes aegypti*. Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental, menggunakan enam konsentrasi ekstrak etanol daun sambiloto, yaitu, 4,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan 15% serta kontrol (-) dan (+) dan masing masing konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Penelitian dilaksanakan berdasarkan panduan WHOPEs tahun 2005. Analisis data menggunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui pengaruh konsentrasi terhadap kematian larva, dan analisis probit untuk menentukan nilai *Lethal Concentration* (LC)₅₀. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna dari pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sambiloto, dan nilai *Lethal Concentration* (LC)₅₀ ekstrak etanol daun sambiloto sebagai larvasida *Aedes aegypti* setelah 24 jam paparan adalah 10,205%. Simpulan, ekstrak etanol daun sambiloto memiliki daya bunuh terhadap larva *Aedes aegypti*.

Kata kunci : *Aedes aegypti*, daun sambiloto, ekstrak etanol, larvasida.

Korespondensi: Alia Salma Nour Fathia. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung , Jalan Hariang Banga No.2 Tamansari, Kota Bandung, Jawa Barat. Telepon: (022) 4321213, E-mail: afathiars@gmail.com

Pendahuluan

Demam berdarah merupakan salah satu masalah masyarakat di dunia, khususnya di Indonesia, yang cenderung semakin luas penyebarannya sejalan dengan meningkatnya mobilitas dan kepadatan penduduk.¹ Menurut CDC, 2010 Demam Berdarah *Dengue* (DBD) ditemukan di daerah tropis dan sub-tropis, dan merupakan penyakit endemik terutama terjadi pada saat musim hujan, karena pada saat musim hujan terjadi kondisi optimal bagi nyamuk untuk berkembang biak. Biasanya sejumlah orang akan terinfeksi dalam waktu yang singkat (wabah).²

Data dari seluruh dunia menunjukkan bahwa Asia menempati urutan pertama dalam jumlah penderita Demam Berdarah *Dengue* setiap tahunnya. Menurut *World Health Organization* (WHO) terhitung sejak tahun 1968 sampai dengan tahun 2009 Indonesia merupakan negara dengan kasus Demam Berdarah *Dengue* (DBD) tertinggi di Asia Tenggara, dan sebagai Negara ke-2 dengan kasus DBD terbesar diantara 30 negara wilayah endemis.⁴

Pengobatan yang spesifik untuk mengatasi penyakit DBD belum tersedia hingga saat ini, dan vaksin untuk mencegah penyakit DBD masih ditangguhkan penggunaannya oleh IDAI (Ikatan Dokter Anak Indonesia) dan WHO. Berbagai cara dilakukan untuk pengendalian penyakit DBD. Langkah terbaik untuk menurunkan angka kejadian DBD yaitu dengan melakukan pencegahan. Salah satu upaya pencegahan adalah dengan

pengendalian vektornya yaitu nyamuk *Aedes aegypti* melalui pemberantasan sarang nyamuk (PSN), pemberantasan stadium larva, hingga pemberantasan stadium dewasa. Pemberantasan stadium larva dapat dilakukan secara hayati atau kimia. Pemberantasan vektor penyakit dengan menggunakan zat kimia diketahui dapat menekan populasi larva dengan baik, akan tetapi metode ini dapat menimbulkan resistensi larva, keracunan dan kematian hewan bukan sasaran, serta pencemaran lingkungan karena bahan aktif sulit terurai di alam.⁷

Berkaitan dengan hal tersebut WHO sejak tahun 1985 menganjurkan untuk mencari terobosan baru, yaitu dengan pengendalian hayati atau pengendalian lingkungan.⁷ Salah satu cara adalah penggunaan bahan biologi alami yang berasal dari tumbuhan. Indonesia merupakan negara tropis yang mempunyai kekayaan sumber daya alam hayati berupa tumbuhan atau tanaman obat.⁸ Salah satu tumbuhan tradisional adalah sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang merupakan salah satu dari sembilan obat tradisional yang diunggulkan untuk dikaji sampai tahap uji klinis. Sambiloto dilaporkan memiliki beragam efek farmakologi seperti anti hiperlipidemi, analgesik, antidiabetes, antipiretik, antioksidan, anti malaria, dan hepatoprotektif⁸ Sambiloto bermanfaat sebagai larvasida karena mengandung beberapa senyawa aktif, yaitu: alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin.

Penelitian bertujuan untuk menilai efek larvasida ekstrak etanol

daun sambiloto terhadap kematian larva *Aedes aegypti*, serta menentukan konsentrasi efektif (LC_{50}) ekstrak etanol daun sambiloto terhadap kematian larva *Aedes aegypti* dalam 24 jam.

Metode Penelitian

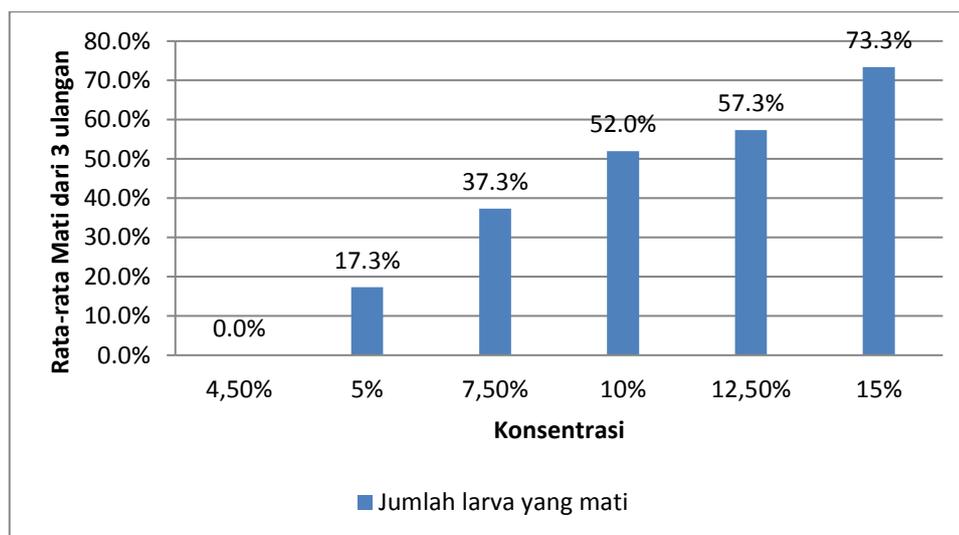
Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik, besar sampel diambil berdasarkan rekomendasi dari *World Health Organization Pesticide Evaluation Scheme* (WHOPES) tahun 2005¹¹, jumlah larva nyamuk *Aedes aegypti* instar III-IV yang digunakan sebanyak 25 ekor untuk setiap konsentrasi larutan ekstrak. Selanjutnya berdasarkan hasil perhitungan aturan replikasi Gomes¹² diperoleh nilai 3 kali pengulangan pada masing masing ekstrak daun sambiloto.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sambiloto, aquadest sebagai kontrol negatif, dan abate sebagai kontrol positif, serta larva *Aedes*

aegypti instar III akhir dan awal instar IV. Alat-alat yang digunakan yaitu baskom plastik, *beaker glass* 200ml, tip mikro pipet, pipet hisap, mikro pipet, *hand gloves*, kertas saring, alat pengaduk dan gelas ukur, serta mikroskop.

Bahan uji diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan ethanol 96% selama 5 x 24 jam, hingga zat aktif terekstraksi. Kemudian ekstrak tersebut dibuat larutan konsentrasi 4,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, dan 15% dimasukkan masing masing konsentrasi ke dalam *cup* plastik, serta aquadest sebagai kontrol negatif dan abate 0,01% sebagai kontrol positif. Selanjutnya dimasukkan sebanyak 25 larva *Aedes aegypti* ke dalam masing masing *cup* plastic, kemudian dilakukan pemeriksaan hasil penelitian setelah 24 jam perlakuan, dengan 3 kali pengulangan dalam hari yang sama. Dihitung jumlah larva yang mati, yaitu larva yang menunjukkan ciri tampak lemah dan tidak aktif.

Hasil Penelitian



Gambar 1 Rerata jumlah kematian larva setelah 24 jam

Gambar 1 menunjukkan konsentrasi daun sambiloto 15% yang menyebabkan kematian larva paling tinggi, juga terlihat prosentasi kematian larva nyamuk yang diperoleh memberikan hasil berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi larutan uji.

Sebelum perhitungan dilakukan uji normalitas *Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui normalitas sebaran data kematian larva *Aedes aegypti*. Uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk Test*.

Tabel 1. Hasil Uji Normalitas Data jumlah larva *Aedes aegypti* Mati

	Konsentras i	Sig.
Larva mati	4.50	.
	5.00	.000
	7.50	.637
	10.00	.000
	12.50	.000
	15.00	.000

Hasil uji memperlihatkan data jumlah larva *Aedes aegypti* mati tidak memenuhi asumsi berdistribusi normal. Nilai signifikansi uji lebih kecil dari 0,05 ($p = < 0,05$) untuk konsentrasi 5%, 10%, 12,5% dan

15%. Hanya pada data konsentrasi 7,5% memenuhi asumsi berdistribusi normal ($p > 0,05$).

Uji homogenitas varians dihitung menggunakan *Levene test* ($\alpha=0,05$), .

Tabel 2. Hasil Pengujian Homogenitas data

		Levene Statistic	Sig.
LarvaMati	Based on Mean	5.380	.008
	Based on Median	.480	.785
	Based on Median and with adjusted df	.480	.780
	Based on trimmed mean	4.472	.016

Hasil uji homogenitas menunjukkan data jumlah larva *Aedes aegypti* mati yang diteliti tidak memiliki varians yang homogen antar kelompok uji. Nilai F_{hitung} sebesar 5,380 dengan signifikansi sebesar 0,008. Nilai signifikans (p) < 0,05, dengan demikian data tidak homogen. Hasil yang diperoleh

dari uji data menunjukkan distribusi data tidak memenuhi asumsi berdistribusi normal dan data tidak homogen sehingga tidak memenuhi syarat untuk uji *One way ANOVA*. Uji alternatif yang digunakan adalah *Kruskal-Wallis*

Tabel 3. Uji Pengaruh Konsentrasi terhadap kematian larva (Kruskal-Wallis Test)

LarvaMati	
Kruskal-Wallis H	16.115
Df	5
Asymp. Sig.	0.007*

(*) beda nyata pada taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$)

Tabel 3 menunjukkan nilai ($p \leq 0,05$) yang berarti bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna dari pemberian konsentrasi ekstrak daun Sambiloto terhadap kematian

larva *Aedes aegypti*. Selanjutnya dilakukan uji *post-hoc Mann-Whitney* untuk mengetahui apakah diantara konsentrasi memiliki perbedaan yang signifikan

Tabel 4. Nilai signifikan *Mann-Whitney U Test*

setiap konsentrasi ekstrak daun sambiloto

Konsentrasi	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)
15 dengan 12.5	-2,023	0,043*
15 dengan 10	-2,023	0,043*
15 dengan 7.5	-1,993	0,046*
15 dengan 5	-2,023	0,043*
15 dengan 4.5	-2,121	0,034*
12.5 dengan 10	-0,225	0,822
12.5 dengan 7.5	-1,993	0,046*

12.5 dengan 5	-2,023	0,043*
12.5 dengan 4.5	-2,121	0,034*
10 dengan 4.5	-2,121	0,034*
10 dengan 5	-2,023	0,043*
10 dengan 7.5	-1,798	0,072
7.5 dengan 5	-1,993	0,046*
7.5 dengan 4.5	-2,087	0,037*
5 dengan 4.5	-2,121	0,034*

(*) beda nyata pada taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$)

Hasil uji *Mann Whitney* pada tabel 4.6 di atas menunjukkan bahwa konsentrasi 15% dan 5% memiliki perbedaan yang bermakna dengan konsentrasi 4,5%, 7.5%, 10%, dan 12.5% dalam mematikan larva *Aedes aegypti*. begitupun sebaliknya. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai *Asymp. Sig (p) < 0.05*.

Uji selanjutnya adalah uji probit yang menunjukkan hasil bahwa konsentrasi efektif ekstrak daun sambiloto terhadap kematian larva *Aedes aegypti* sebanyak 50% (LC_{50}) dalam 24 jam adalah 10,205% dengan batas bawah 9,367% dan batas atas 11,240%

Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sambiloto memiliki daya bunuh terhadap kematian larva nyamuk *Aedes aegypti*, dan kematian larva meningkat sesuai dengan peningkatan konsentrasi (gambar 4). Hasil tersebut diperkuat dengan uji *Kruskal-Wallis* yang menunjukkan nilai ($p \leq 0,05$), berarti bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna dari pemberian konsentrasi ekstrak

daun Sambiloto terhadap kematian larva *Aedes aegypti*. Selanjutnya diperoleh konsentrasi efektif dari analisis probit pada penelitian, yaitu didapatkan hasil LC_{50} setelah 24 jam paparan terletak pada konsentrasi 10,205%.

Berbeda dengan penelitian Rahmayanti (2016) yang mendapatkan hasil penelitiannya menunjukkan konsentrasi minimal ekstrak daun sambiloto yang dapat mematikan pupa dan larva *Aedes aegypti* dengan LC_{50} menunjukkan nilai sebesar 3,01% (v/v) dan 1,20% (v/v).¹⁰ Hal ini disebabkan karena suhu pengeringan pada proses pembuatan simplisia daun sambiloto yang berbeda. Proses pengeringan yang dilakukan pada penelitian ini adalah dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 55⁰C, sedangkan pada penelitian Rahmayanti daun sambiloto dikeringkan dengan cara diangin anginkan pada suhu kamar sampai kering. Pengeringan bahan alam bisa dilakukan dengan berbagai cara, tergantung tujuan yang diinginkan. Menurut Sembiring (2009) hasil penelitiannya menunjukkan terdapat pengaruh cara

pengeringan terhadap mutu ekstrak kering sambiloto, demikian pula hasil penelitian Patin (2018) memperlihatkan bahwa terdapat pengaruh variasi suhu pengeringan terhadap sifat fisiko kimia teh daun sambiloto. Pengeringan dengan cara dikeringanginkan dapat menghindari kerusakan beberapa zat aktif dalam bahan alam, sedangkan pada pemanasan oven kemungkinan besar bahan-bahan volatil seperti minyak atsiri dapat menguap. Pengeringan dengan cara dikeringanginkan paling baik hanya pelaksanaannya perlu diperiksa, karena apabila kelembaban udaranya tinggi, bahan alam mudah rusak karena proses enzimatik.^{43,44}

Perbedaan lain adalah pada bahan penelitian, Rahmayanti (2016) melakukan metode ekstraksi sambiloto dengan cara maserasi menggunakan pelarut air, sedangkan peneliti menggunakan cara maserasi dengan pelarut etanol. Menurut Suryani, perbedaan jenis pelarut akan mempengaruhi rendemen ekstrak, kapasitas anti oksidan, aktivitas anti oksidan (LC₅₀), flavonoid secara kualitatif, dan total flavonoid. Pengaruh jenis pelarut juga telah diteliti oleh Rais (2014), hasil penelitiannya menyatakan bahwa senyawa andrografolid bersifat larut dalam pelarut semipolar seperti etanol dan kloroform.^{45,46}

Disamping perbedaan cara pengeringan daun sambiloto dan jenis pelarut ekstraksi terdapat juga perbedaan besar sampel penelitian, Rahmayanti untuk setiap wadah pada setiap konsentrasi sebanyak 20 larva dengan 4 perlakuan, dan 3 kali pengulangan, sedangkan pada

penelitian ini mengikuti rekomendasi WHO (2005)⁴¹, besar sampel 25 larva pada setiap wadah, 6 perlakuan, dan 3 kali pengulangan. Besar sampel yang berbeda dapat mempengaruhi pada perhitungan statistik.

Penelitian mengenai efektivitas daun sambiloto sebagai larvasida organik juga pernah dilakukan oleh Tabibul *et al* (2012) terhadap larva nyamuk *Anopheles stephensi* dengan pembuatan ekstrak daun sambiloto dimana konsentrasi sebesar 79,68 ppm dapat membunuh 50% larva. Selain itu Renugadevi (2013) menunjukkan bahwa ekstrak daun sambiloto dapat mematikan larva Instar IV *Culex quinquefasciatus* pada LC₅₀ sebesar 117,73 ppm. Begitu pula pada penelitian Wannee (2015) menunjukkan bahwa ekstrak daun sambiloto dapat mematikan larva *Culex quinquefasciatus* pada LC₅₀ sebesar 15,93 ppm.^{47,48,49}

Perbedaan konsentrasi minimal ekstrak sambiloto terhadap beberapa genus nyamuk yaitu *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, dan *Aedes aegypti* dapat disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel diantara ketiga macam nyamuk tersebut, sehingga mempengaruhi ketahanan larva terhadap kekuatan senyawa aktif pada ekstrak sambiloto. Hasil ini sesuai dengan penelitian Laelatul (2010), bahwa ekstrak etanol limbah penyulingan minyak akar wangi dapat mematikan larva *Anopheles stephensi* pada LC₅₀ sebesar 482,7 ppm, larva *Culex quinquefasciatus* LC₅₀ sebesar 7095,4 ppm dan larva *Aedes aegypti* LC₅₀ sebesar 1373,6 ppm.⁵⁰

Beberapa penelitian di atas dilaksanakan di India, menurut Narulita (2014), disamping teknik pengeringan dan teknik pemisahan zat aktif, secara alamiah kualitas senyawa bioaktif dalam tumbuhan hidup ditentukan oleh faktor internal, yaitu genetik dan umur tanaman, serta dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti iklim, geografi, hama dan penyakit. Selain kedua faktor tersebut, waktu panen, dan penanganan pascapanen juga dapat berpengaruh terhadap kualitas simplisia.⁵¹

Hasil penelitian Thangavel (2015),¹⁶ Aseptianova (2017)⁵⁴ menyimpulkan bahwa pada ekstrak beberapa tanaman termasuk sampiloto sebagai insektisida nyamuk penular DBD sebagian besar mengandung flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid. Saponin memiliki efek sebagai larvasida karena menurunkan tegangan permukaan selaput mukosa traktus digestivus larva sehingga dinding traktus digestivus larva menjadi korosif. Flavonoid berfungsi sebagai inhibitor kuat pada sistem pernafasan serangga, sementara itu alkaloid berupa garam sehingga dapat mendegradasi membran sel untuk masuk ke dalam dan berfungsi sebagai racun perut dimulai ketika masuk ke saluran pencernaan, kemudian merusak sistem syaraf dan menghambat kerja enzim asetil kolinesterase. Tanin diketahui dapat menghalangi serangga dalam mencerna makanan, karena dapat mengikat protein yang diperlukan serangga untuk pertumbuhan.⁹

Simpulan

Ekstrak etanol daun

sambiloto efektif sebagai larvasida karena memiliki daya bunuh pada larva nyamuk *Aedes aegypti*. Konsentrasi efektif terhadap kematian larva nyamuk *Aedes aegypti* sebanyak 50% (LC₅₀) dalam 24 jam adalah 10,205%

Ucapan Terimakasih

Terima kasih kepada institusi, dosen serta staf Fakultas Kedokteran Universitas Islam Bandung, dan seluruh pihak yang telah turut membantu dalam penelitian ini.

Pertimbangan Masalah Etik

Persetujuan Etik No: 123/Komisi Etik.FK/III/2018

Daftar Pustaka

- Handoko D. dalam: Burni E, Hartoyo S, editors, 2011. Modul pengendalian demam berdarah dengue. Edisi ke-2.
- Info Datin Kementerian Kesehatan. Situasi DBD di Indonesia. Info DATIN. 2016. P. p 12.
- World Health Organization. A global brief on vector-borne diseases. World Heal Organ. 2014;9
- Kementerian Kesehatan RI. Demam Berdarah Dengue. Buletin Jendela Epidemiologi. 2010;2:48
- Pikiran Rakyat. 2016. *Kasus Demam Berdarah Terbanyak Terjadi di Kota Bandung*. Bandung: Pikiran Rakyat.

- Cania E, Setyanimrum E. *Uji Efektivitas Larvasida Ekstrak Daun Legundi (Vitex trifolia) terhadap Larva Aedes aegypti*. Med J Lampung Univ 2013;52(4):52-60.
- Rahmayanti Lisa. 2016. *Pengaruh Ekstrak Daun Salmbiloto terhadap Pupa dan Larva Aedes aegypti*. Wannee. 2015. *Larvicidal and Histopathological Effects of Andrographis paniculata Leaf Extract Against Culex quinquefasciatus Larva*. Thailand: Mahidol University.
- Tabibul, Megbahul H.M., Shahed C.I., Shakhawat H.M 2012. *Effects of Andrographis paniculata Nees on Growth, Development and Reproduction of Malarial Vector Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae)*. India: Bharathiar University.
- Govindarajan, M.2011. *Evaluation of Andrographis paniculata Burm.f.(Family: Acanthaceae) Extracts Against Culex quinquefasciatus (Say.) and Aedes aegypti (Linn.) (Diptera: Culicidae)*. India: Annamalai University.
- WHO. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Heal Organ [Internet]. 2005;1-41. Available from:http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_CDS_WHOPEP_GCDPP_2005.13.pdf?ua=1
- Gomes and Gomes. *Prosedur Statistik Untuk Penelitian Pertanian*. 1995.
- Lianawati, H.2012. *Uji Efektivitas Daun Pare (Momordica charantia) terhadap Kematian Larva Nyamuk Aedes aegypti Linnaeus*. Semarang: Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Diponegoro.
- Rais, I.R. 2014. *Andrographolide Extraction from Andrographis paniculata Nees*. Thailand: Pharmacia, Vol.4, No.1. pp 85-92.
- Demam P, Dengue B. Efektifitas pemanfaatan tanaman sebagai insektisida elektrik untuk mengendalikan nyamuk penular penyakit dbd. 2017;3(2):10-9.
- Vogal, A.L. 1978. *Text Book of Practical Organic Chemistry*. London: The English Language Society and Longman. pp 136-137.
- Pujdiadi, A. 2007. *Dasar-Dasar Bahan Obat*. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Evans, G.C 1972. *The Organic Chemistry Analysis of Plant*. Oxford: Blackwell Sci. Ed.1. pp 190-197.
- Farida, W.R, Pratiwi, Semiadi, G. 2000. *Tanin dan pengaruhnya pada Ternak*. Jakarta: EGC. Ed.1, No.1. pp 66-70