

Penetapan Kadar Metilripariokromen-A pada Organ *Eupatorium riparium* Reg. dari Daerah yang Berbeda

Determination of Methylripariochromene-A Contents at *Eupatorium riparium* Reg. Collected from Different Areas

Linus Y. Chrystomo^{1*}, Issirep Sumardi¹, L. Nugroho Hartanto¹, dan Subagus Wahyuono²

¹Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

E-mail: chrystyanka@yahoo.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Methylripariochromene-A is an active compound that occurs in *Eupatorium riparium* Reg. belonging to Asteraceae family. It is used to treat hypertension, diuretics, systolic heart failure, and Na⁺, K⁺, Cl⁻ excretion, and also used in inhibiting colony of *Aspergillus flavus*, cytotoxic effect toward *Collectotrichum gloeosporioides*. However, *Eupatorium riparium* Reg inhibited the growth of *Galinsoga ciliate* and *G. parviflora* seeds. This plant is potential to be developed further for medical use, fungicide and herbicide. This research aims to identify the methylripariochromene-A on the leaf, bark and root of *E. riparium*, and to determine the methylripariochromene-A on *wasbensen* extract of *E. riparium* collected from Mt. Merapi in Kaliurang, Menoreh mountains in Samigaluh and Tawangmangu in Karanganyar. Concentration of bioactive compounds can vary with growing abiotic and genotype conditions. The method in analyzing the identification and determination of the content is thin layer and densitometry chromatogram, (TLC-Densitometry). The result of TLC-Densitometry analysis showed that the methylripariochromene-A was only found on *E. riparium* leaf. The highest of methylripariochromene-A by *wasbensen* extract of leaf is respectively from Menoreh mountains in Samigaluh (9.48%), Tawangmangu Karanganyar (9.30%) and Mt. Merapi in Kaliurang (5.37).

Key words: Methylripariochromene-A, *Eupatorium riparium* Reg., TLC-Densitometry

Abstrak

Metilripariokromen-A merupakan senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman *Eupatorium riparium* Reg.(Asteraceae). Metilripariokromen-A memiliki aktivitas yang berhubungan dengan tekanan darah tinggi seperti aktivitas vasodilatasi, diuretik, penurunan laju denyut jantung, penurunan tekanan darah sistolik, ekskresi Na⁺, K⁺ dan Cl⁻. Metilripariokromen-A juga mampu menurunkan pertumbuhan koloni jamur *Aspergillus flavus*, toksis terhadap jamur patogen *Collectotrichum gloeosporioides*, menghambat perkecambah biji gulma *Galinsoga ciliate* dan *G. parviflora*. *E. riparium* mempunyai potensi sebagai sumber bahan alam untuk pembuatan obat, fungisida dan herbisida. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi metilripariokromen-A pada organ akar, batang dan daun *E. riparium* serta untuk menetapkan kadar metilripariokromen-A pada ekstrak was bensen *E. riparium* yang berasal dari daerah G. Merapi Kaliurang, G. Menoreh Samigaluh dan Tawangmangu Karanganyar. Konsentrasi senyawa bioaktif sangat tergantung dengan kondisi lingkungan abiotik dan genotif. Metode yang digunakan untuk analisis identifikasi dan penetapan kadar metilripariokromen-A adalah Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri (KLT-Densitometri). Berdasarkan hasil analisis KLT-Densitometri menunjukkan bahwa metilripariokromen-A hanya terdapat di dalam organ daun. Hasil penetapan kadar metilripariokromen-A menunjukkan ada perbedaan yang signifikan antarsampel dari ketiga daerah yang berbeda. Kadar metilripariokromen-A tertinggi terdapat dalam ekstrak was bensen daun *E. riparium* yang berasal dari G. Menoreh Samigaluh (9,48%) selanjutnya dari G. Merapi Kaliurang (5,37%) dan dari Tawangmangu Karanganyar (9,30%).

Kata kunci: Metilripariokromen-A, *Eupatorium riparium* Reg., KLT-Densitometri

Diterima: 15 Februari 2010, disetujui: 14 Oktober 2010

Pendahuluan

Salah satu tumbuhan di Indonesia yang berdasarkan kearifan masyarakat dimanfaatkan untuk pengobatan dan pencegahan penyakit atau untuk pemeliharaan kesehatan adalah tumbuhan tekelan (*Eupatorium riparium* Reg.). Tumbuhan tersebut mengandung senyawa bioaktif metilripariokromen-A, senyawa bioaktif itu diidentifikasi berdasarkan data spektrum massa (MS), ultraviolet (UV), infra merah (IR) dan resonansi magnetik inti ($^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$) (Fakhrudin, 2006). Menurut Thomson (2007) kandungan konsentrasi senyawa bioaktif sangat tergantung kondisi ekologi dan sifat genotif tumbuhan tersebut. Edreva *et al.*, (2008) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa untuk menghadapi perubahan lingkungan dan tekanan kondisi abiotik yang berlebihan beberapa tanaman menghasilkan metabolit sekunder yang berperan dalam adaptasi, toleransi, protektif dan strategi pertahanan diri. Menurut Terry *et al.*, (2006) metabolit sekunder diproduksi tanaman karena adanya respons tekanan biotik dan abiotik untuk beradaptasi dengan lingkungan ekologi yang spesifik. Metilripariokromen-A merupakan metabolit sekunder kelompok *chromene* yang mempunyai *building block* (C_6C_3) turunan dari *L-phenylalanine* (Dewick, 2000). Kerangka dasar struktur senyawa metilripariokromen-A dapat dilihat pada Gambar 1.

Metilripariokromen-A (6-asetil-7,8-dimetoksi-2,2-dimetilkromen) hasil isolasi dari *E. riparium* mempunyai aktivitas antifungi terhadap fungi patogen seperti *Colletotrichum gloeosporioides* yang hidup di daerah tropik (Bandara *et al.*, 1992).

Metilripariokromen-A mempunyai LC_{50} BST (*Brine Shrimp lethality Test*) = $2,24 \times 10^{-5}$ M ($5,86 \mu\text{g/ml}$) terhadap larva *Artemia salina*, Leach. Uji sitotoksitas secara selular *in vitro* terhadap sel Hela (turunan sel kanker leher rahim) dan sel Vero (turunan sel epitel ginjal kera hijau Afrika *Cercopithecus aethiops*) menunjukkan bahwa metilripariokromen-A mempunyai nilai LC_{50} $2,23 \times 10^{-4}$ M ($58,32 \mu\text{g/ml}$) terhadap sel Hela dan $3,09 \times 10^{-4}$ M ($80,95 \mu\text{g/ml}$) terhadap sel Vero (Fakhrudin, 2006).

Menurut Rai dan Tripathi (2005) *E. riparium* mempunyai efek alelopati terhadap populasi gulma *Galinsoga ciliata* Raf. dan *Galinsoga parviflora* Cav. Pengujian ekstrak air *E. riparium* dapat menghambat perkecambahan biji serta menghambat pertumbuhan radikula dan plumulae *Galinsoga ciliata* Raf. dan *Galinsoga parviflora* Cav. Uji lain terhadap fungi memperlihatkan menurunnya pertumbuhan koloni dan kemelimpahan fungi *Aspergillus flavus*.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan teknik sederhana yang cepat untuk menelusuri dan identifikasi senyawa alami, sedangkan KLT-densitometri dapat digunakan untuk analisis hitungan kuantitatif (Lotfi *et al.*, 2008), dengan menggunakan KLT Gheorge *et al.*, (2008) dapat mengidentifikasi senyawa organik dalam campuran obat ilegal seperti kafein, kodein dan fenilbarbital. Cetkovic *et al.*, (2003) menggunakan KLT untuk analisis dan penelusuran senyawa dalam ekstrak metanol, petroleum eter, kloroform, etil asetat, n-butanol dan air dari *Calendula officinalis* L. Teknik KLT dapat digunakan untuk analisis ekstrak *Spinach* (Laughlin dan Masters, 2004). Menurut Sajewicz *et al.*, (2005) KLT merupakan teknik pemisahan yang sangat efisien untuk senyawa yang tidak dapat di simpan lama dalam medium yang mengandung air. Menurut Puiol *et al.*, (2005) aplikasi KLT dan KLTKT (Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi) merupakan teknik yang digunakan untuk pemisahan, identifikasi dan hitungan kuantitatif unsur lipid dalam 6 jenis kacang-kacangan.

Berdasarkan kajian informasi ilmiah dan informasi awal pengetahuan kearifan masyarakat yang telah dikemukakan, *E. riparium* mempunyai potensi sebagai sumber bahan alam yang dapat dimanfaatkan untuk pembuatan obat, fungisida dan herbisida. Walaupun demikian senyawa bioaktif metilripariokromen-A belum diketahui secara pasti apakah senyawa tersebut terdapat di bagian organ akar, batang atau daun dari tanaman *E. riparium*. Berapa besar kadar metilripariokromen-A dalam tanaman *E. riparium* yang diambil dari asal daerah yang lingkungan abiotiknya berbeda seperti di daerah Gunung Merapi Kaliurang, Gunung

Menoreh Samigaluh dan Tawangmangu Karanganyar. Menurut Thomson (2007) kandungan konsentrasi senyawa bioaktif sangat tergantung kondisi ekologi dan sifat genotif tanaman tersebut sedangkan menurut Terry et al., (2006) metabolit sekunder diproduksi tanaman karena adanya respons tekanan biotik dan abiotik untuk beradaptasi dengan lingkungan ekologi yang spesifik. Bertitik tolak dari permasalahan tersebut maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut 1). Di bagian organ mana terdapatnya senyawa bioaktif metilripariokromen-A pada tanaman *E riparium* 2). Berapa besar kadar metilripariokromen-A pada *E riparium* yang diambil dari daerah yang berbeda. Untuk menjawab permasalahan tersebut, dilakukan penelitian ini yang bertujuan : 1). Mengidentifikasi senyawa bioaktif metilripariokromen-A pada organ akar, batang dan daun *E. Riparium* 2). Penentuan kadar metilripariokromen-A pada *E riparium* yang didapatkan dari daerah Gunung Merapi Kaliurang, Gunung Menoreh Samigaluh dan Tawangmangu Karanganyar.

Metode Penelitian

Bahan kimia yang digunakan untuk penentuan kadar metilripariokromen-A adalah kloroform (E.Merck), metanol (E.Merck), etilasetat (E.Merck), was bensin, akuades, pereaksi semprot Cerium (IV) Sulfat, silika gel 60 PF₂₅₄ alumunium (E.Merck), isolat murni metilripariokromen-A, simplisia *E riparium* (dari G. Merapi Kaliurang, G. Menoreh Samigaluh dan Tawangmangu Karanganyar) dan alat yang digunakan untuk penyarian:

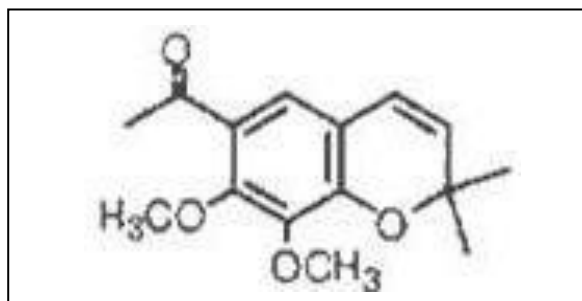
bejana maserator, cawan porselin, corong Buchner, kertas saring, alumunium foil, *waterbath*, kipas angin, alat timbang analitik, spatula, pipet tetes, alat-alat gelas, alat yang digunakan untuk KLT : KLT, mikropipet, bejana KLT, *dryer*, lampu UV₂₅₄, lampu UV₃₆₅, pensil, penggaris, oven, penyemprot bercak, kamera digital, *Camag TLC Scanner 3*.

Metode yang digunakan untuk penetapan kadar metilripariokromen-A yaitu dengan menggunakan KLT-Densitometri

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM dimulai bulan Januari sampai dengan bulan Juli 2009.

Pembuatan Kurva Baku Metilripariokromen-A

Pembuatan kurva baku metilripariokromen-A digunakan untuk menentukan persamaan garis fungsi yang selanjutnya digunakan untuk penetapan kadar metilripariokromen-A. Senyawa murni metilripariokromen-A dari hasil isolasi *E riparium* dibuat larutan dalam kloroform dengan konsentrasi : 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 µg/ml. Masing-masing konsentrasi metilripariokromen-A larutan kloroform tersebut kemudian di totolkan pada lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ dengan mikropipet kemudian dikembangkan dengan menggunakan larutan fase gerak was bensin : etil asetat (5:1) (v/v). Selanjutnya, profil KLT hasil pengembangan kemudian di analisis dengan densitometri menggunakan *Camag TLC Scanner-3* untuk mendapatkan kromatogram kurva baku dan persamaan fungsi.



Gambar 1. Struktur metilripariokromen-A (Shibuya et.al., 1999).

Identifikasi Metilripariokromen-A dalam Ekstrak Was Bensin Akar, Batang dan Daun *E. riparium*

Ekstrak was bensin akar, batang dan daun *E. riparium* yang sudah diuapkan masing-masing dilarutkan dalam kloroform lalu dianalisis dengan KLT menggunakan metilripariokromen-A sebagai standar. Hasil KLT diamati dengan UV₂₅₄, UV₃₆₅ lalu disemprot pereaksi Cerium IV Sulfat. Profil yang sama dengan standar mengindikasikan adanya metilripariokromen-A.

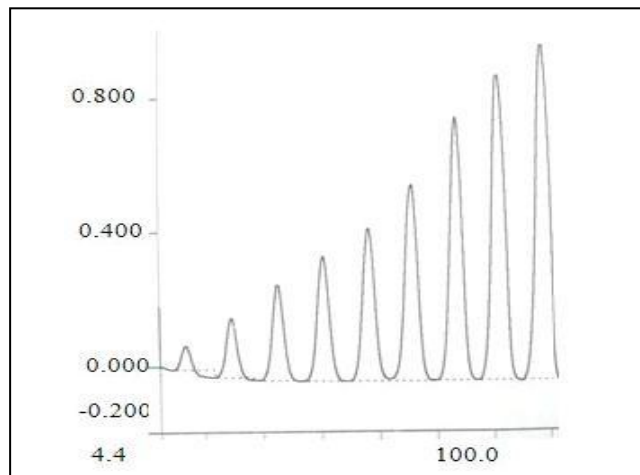
Penetapan Kadar Metilripariokromen-A dalam Ekstrak Was Bensin daun *E. riparium* Asal Lokasi Berbeda

Ekstrak was bensin tiap-tiap daun *E. riparium* dari lokasi yang berbeda (G. Merapi Kaliurang, G. Menoreh Samigaluh dan Tawangmangu Karanganyar) yang sudah diuapkan lalu dilarutkan dengan kloroform

kemudian dianalisis dengan KLT (menggunakan standar metilripariokromen-A). Setelah itu diamati dengan UV₂₅₄ dan UV₃₆₅. Untuk penetapan kadar metilripariokromen-A hasil KLT kemudian dianalisis dengan densitometri menggunakan *Camag TLC Scanner 3* dan selanjutnya hasil densitometri dimasukkan ke dalam persamaan fungsi kurva baku.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil KLT larutan metilripariokromen-A dalam kloroform dengan konsentrasi bertingkat diperoleh kurva baku kromatogram (Gambar 2) dan persamaan garis fungsi $y = 11615x + 864,26$ dengan nilai $r = 0,9992$ (Gambar 3). Persamaan garis fungsi tersebut selanjutnya digunakan untuk penetapan kadar metilripariokromen-A.



Gambar 2. Kromatogram Kurva Baku Metilripariokromen-A.



Gambar 3. Grafik Persamaan Garis Fungsi ($Y=11615X + 864,26$; $r = 0,9992$) Kurva Baku Metilripariokromen-A.

Analisis profil hasil KLT ekstrak was bensin organ akar, batang dan daun *E riparium* dengan menggunakan standar metilripariokromen-A menunjukkan bahwa senyawa bioaktif metilripariokromen-A ternyata tidak dijumpai pada organ akar dan batang tetapi hanya dijumpai pada daun (Gambar 4). Hal ini dapat dilihat adanya bercak D (sampel daun) dan bercak S (standar metilripariokromen-A) yang identik dan dapat dilihat dibawah lampu UV₂₅₄ dan lampu UV₃₆₅ (bercak kebiruan) serta dapat dipastikan juga setelah disemprot dengan Cerium Sulfat IV (bercak kecoklatan).

Kandungan metilripariokromen-A dimungkinkan terdapat di organ daun karena menurut Dewick (2002) biosintesis senyawa bioaktif metilripariokromen-A diturunkan dari senyawa metabolit primer hasil proses fotosintesis di daun melalui jalur glikolisis, selanjutnya masuk ke jalur metabolisme asam sikimat, lalu terjadi sintesis fenilalanin, kemudian terjadi sintesis *building block* senyawa C₆C₃. Selanjutnya, terjadi sintesis senyawa kromen, akhirnya melalui proses oksigenasi dan metilasi menjadi senyawa metilripariokromen-A.

Jadi awal terbentuknya senyawa metabolit primer yang diturunkan sampai menjadi senyawa bioaktif metilripariokromen-A terjadi di organ daun melalui proses fotosintesis (Dewick, 2002). Adapun proses fotosintesis membutuhkan organela kloroplast yang mengandung klorofil yang umumnya dijumpai di organ daun (Solomon et al., 2008).

Analisis profil hasil KLT ekstrak was bensin daun *E riparium* dari lokasi G. Merapi Kaliurang (1), G. Menoreh Samigaluh (2) dan Tawangmangu Karanganyar (3) menggunakan standar metilripariokromen-A (S) menunjukkan bahwa semua sampel mengandung senyawa bioaktif metilripariokromen-A. Hal ini dapat dilihat adanya bercak (kebiruan) dari semua sampel (1, 2 dan 3) yang identik dengan bercak standar metilripariokromen-A (S) semuanya dapat dilihat di bawah sinar lampu UV₂₅₄ dan lampu UV₃₆₅ demikian pula setelah dipastikan dengan disemprot penanda Cerium Sulfat IV semuanya kelihatan kecoklatan (S ,1, 2, 3) (Gambar 5).

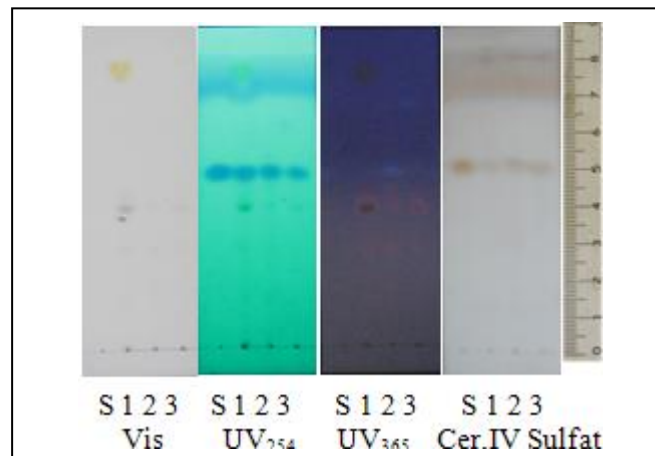
Daun tanaman *E riparium* dari lokasi G. Merapi Kaliurang, G. Menoreh Samigaluh dan Tawangmangu Karanganyar mempunyai kandungan senyawa bioaktif yang sama yaitu metilripariokromen-A karena secara genetik dalam satu spesies yang sama juga mempunyai kemampuan sifat menurun yang sama, demikian pula kemampuan untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang sama pula. Solomon et al., (2008) menjelaskan bahwa gen merupakan sumber informasi yang stabil dan tidak mudah berubah yang diturunkan dari generasi ke generasi berikutnya. Menurut Dewick (2002) setiap organisme memiliki kemampuan untuk mentransformasi dan mengkonversi senyawa organik menjadi senyawa antara yang digunakan untuk mempertahankan kehidupan, pertumbuhan dan reproduksi organisme yang bersangkutan.

Setelah dimasukkan ke dalam persamaan garis fungsi kurva baku $y=11616x + 864.25$ kadar metilripariokromen-A dalam ekstrak was bensin daun *E. riparium* yang berasal dari G. Merapi Kaliurang = 5,37%, dari G. Menoreh Samigaluh = 9,48% dan dari Tawang mangu Karanganyar = 9,30% (Gambar 6) dan (Tabel 1). Kadar metilripariokromen-A yang tertinggi terdapat pada *E. riparium* yang berasal dari G. Menoreh Samigaluh karena daerah G. menoreh mempunyai kisaran temperature lebih tinggi dan kelembabannya relatif lebih rendah dibanding daerah G. Merapi dan Tawangmangu. Menurut Dewick (2002) biosintesis metilripariokromen-A diturunkan melalui beberapa tahapan dari metabolit primer hasil proses fotosintesis. Proses fotosintesis *E riparium* di daerah G. Menoreh dimungkinkan lebih efektif karena temperatur atau cahaya matahari lebih memadai atau sesuai demikian pula kelembaban udara di daerah G. Menoreh lebih efektif dalam meningkatkan proses fotosintesis pada daun tumbuhan *E riparium* tersebut. Menurut Solomon (2008) proses fotosintesis dapat berlangsung efektif apabila kinerja enzim-enzim yang bekerja dalam proses fotosintesis tidak dihambat oleh pengaruh lingkungan yang stress. Biosintesis senyawa bioaktif metilripariokromen-A ditentukan efektivitas kinerja enzim yang dipengaruhi factor lingkungan terutama temperatur, kelembaban dan cahaya matahari.

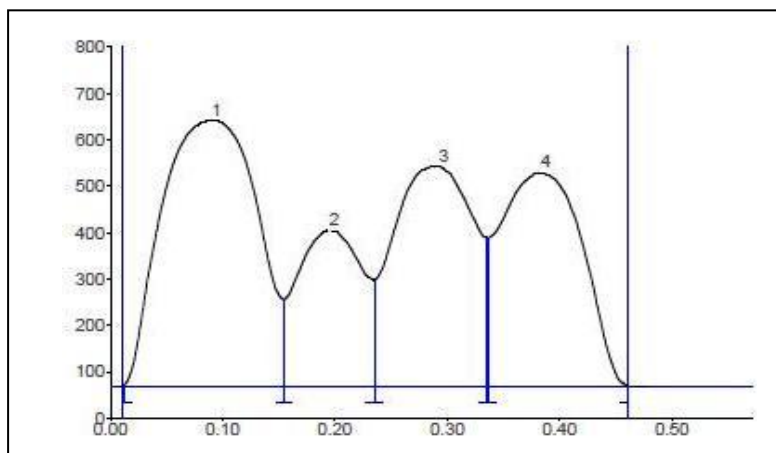
Kadar Metilripariokromen-A Pada Organ *Eupatorium riparium*

Kadar metilripariokromen-A ekstrak was bensin daun *E. riparium* yang berasal dari daerah G. Merapi Kaliurang, G. Menoreh Samigaluh dan Tawangmangu Karanganyar

dihitung dan dimasukkan ke dalam persamaan garis fungsi kurva baku metilripariokromen-A, hasilnya disajikan seperti pada Tabel 1.



Gambar 5. Profil KLT ekstrak was bensin *E.riparium* yang berasal dari G. Merapi Kaliurang (1), G. Menoreh Samigaluh (2), Tawangmangu Karanganyar (3), Standar Metilripariokromen-A (S). Fase gerak:was bensin : etil asetat (5:1)(v/v). Fase diam: Silica gel 60F₂₅₄.



Gambar 6. Kromatogram KLT-Densitometri Ekstrak Was bensin *E.riparium* ($\lambda=254$).
 1. Peak standar metilripariokromen-A
 2. Peak sampel daun *E.riparium* asal G. Merapi Kaliurang
 3. Peak sampel daun *E.riparium* asal G. Menoreh Samigaluh
 4. Peak sampel daun *E.riparium* asal Tawangmangu Karanganyar

Tabel 1. Hasil evaluasi KLT-Densitometri ekstrak was bensin daun *E.riparium*.

Daerah Pengambilan Sampel <i>E.riparium</i>	Kadar Metilripariokromen-A Ekstrak was Bensin (%)
G. Merapi Kaliurang	5,37
G. Menoreh Samigaluh	9,48
Tawangmangu Karanganyar	9,30

Simpulan dan Saran

Simpulan

Hasil analisis KLT menggunakan standar metilripariokromen-A terhadap ekstrak was bensin organ akar, batang dan daun *E. riparium* menunjukkan bahwa yang mengandung metilripariokromen-A hanya pada organ daun. Hasil penetapan kadar metilripariokromen-A dalam ekstrak was bensin daun *E. riparium* dari daerah G. Merapi Kaliurang, G. Menoreh Samigaluh dan Tawangmangu Karanganyar adanya perbedaan konsentrasi yang signifikan (5,37%, 9,48% dan 9,30%). Hasil penetapan kadar metilripariokromen-A dalam ekstrak was bensin sampel dari G. Menoreh Samigaluh memiliki kadar tertinggi yaitu 9,48%.

Saran

Perlu kajian lebih lanjut tentang kandungan senyawa bioaktif metilripariokromen-A di daerah yang perbedaan kondisi lingkungan abiotiknya lebih nyata.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada : Kepala Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang telah memberikan izin menggunakan fasilitas laboratorium dan Program IM-HERE Universitas Cenderawasih Jayapura yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Bandara, B.M.R., Hewage, C.M., Karunaratne, V., Wannigama, G.P. dan Adikaram, N.K.B. 1992. An Antifungal Chromene from *Eupatorium riparium* Reg. *Phytochemistry*, 31 (6): 1983–1985.
- Cetkovic, G.S., Dilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M. dan Tumbas, V.T. 2003. Thin Layer Chromatography Analysis and Avening Activity of Marigold (*Calendula officinalis* L.) Extract, Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar Cara Lazara.
- Dewick, P.M. 2002. Medical Natural Products, A Biosynthetic Approach, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd. pp.7-11, 121-123, 130-132.
- Fakhrudin, N. 2006. Skrining Senyawa Sitotoksik Dari Tumbuhan Asal Taman Nasional Gunung Merapi Yogyakarta : Kajian Terhadap *Eupatorium riparium*. Tesis. Jurusan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Program Studi Ilmu Farmasi, Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Gheorghe, M., Balalau, D., Ilie, M., Baconi, D.L. dan Ciobanu, A.M. 2008. Qualitative Analysis of Confiscated Illegal Drugs by Thin Layer Chromatography. *Farmacia*, 16 (5): 541–546.
- Laughlin, R.M. dan Masters K., dalam William, G.G., Hao, T.Q., Robert, L.S. 2004. Extraction and Thin Layer Chromatography of Chlorophyll A and B from Spinach, *Chem.*, 81: 385–387
- Lotfi, W.M., Hassan, R.A., Tawfik, W.A. dan Habib, A.A. 2008. Determination of Natural Colors by Thin Layer Chromatography. *J. of Applied Sciences Research*, 4 (12): 2013–2017.
- Puio, G., Orellana, J.M., Rozes, N., Duran, J.R. dan Romeu, A. 2005. Thin Layer Chromatography of Lipid Fraction in Tree Nuts Species, Department of Biochemistry and Biotechnology, University RoviraVirgili, Tarragona Spain.
- Rai, J.P.N. dan Tripathi, R.S. 2005. Allelopathic Effects of *Eupatorium riparium* Reg. on Population Regulation of Two species Galinsoga and Soil Microbes. *Plant and Soil*, 80: 105–117.
- Sajewicz, M., Pietka, R., Pieniak, A. dan Kowalska, T. 2005. Application of Thin Layer Chromatography (TLC) to Investigating Oscillatory Instability of The Selected Proven Enantiomers, *Acta Chromatographica*, Institut of Chemistry, Silesian University, Katowice Poland.
- Shibuya, S., Ohashi, K. dan Kitagawa, L. 1999. Search for Pharmacochemical Leads from, Tropical Rainforest Plants. *S Pure Appl. Chem.*, 71 (6): 1109–1113.
- Solomon, E.P., Berg L.R. dan Martin, D.W. 2008. Biology, Eighth Edition, Thomson Learning Academic Resource Center, Publisher Peter Adams, Australia, Canada, United Kingdom, United States.
- Terryn, N., Montagu, M.V., Inze, D. dan Goossens, A. 2006. Functional Genomic Approaches to Study and Engineer Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. In: Bogers, R.J., Craker, L.E. & Lange, D. (Eds). *Medicinal and Aromatic Plants*. Pp. 291-300. Springer, Netherlands.
- Thomson, G.E. 2007. The Health Benefits of Traditionil Chinese Plant Medicine, A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No 06/128, RIRDC Project No DAV-227A.