

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DARI SENYAWA HASIL EKSTRAKSI DAUN
NYAMPLUNG (*Calophyllum inophyllum* Linn.)**

**(ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF EXTRACT NYAMPLUNG (*Calophyllum
inophyllum* Linn.) LEAVES)**

Mutiara Novianti *, Qurrotul Aini, Irma Fadhila Putri, Triana Kusumaningsih

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas
Maret, Jl. Ir. Sutami No. 36A, Kertingan Surakarta

*email: mutiaranovianti@gmail.com

Received 08 June 2015, Accepted 15 October 2015, Published 01 September 2015

ABSTRAK

Telah dilakukan skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) dari Indonesia terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Ekstraksi dilakukan dengan ekstraksi soklet menggunakan pelarut etanol. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode *Optical Density* pada max 600 nm. Hasil pemeriksaan skrining fitokimia ekstrak etanol daun nyamplung menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid, saponin, tanin dan fenol serta triterpenoid. Uji aktivitas antibakteri menunjukkan aktivitas antibakteri ekstrak etanol paling besar pada waktu inkubasi 3 jam dengan persentase inhibisi 59,03 %.

Kata Kunci: aktivitas antibakteri, daun nyamplung, senyawa metabolit sekunder

ABSTRACT

Phytochemical screening and antibacterial activity from ethanol extract of nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) leaves from Indonesia against *Escherichia coli* has been done. The extraction was done by soklet extraction using ethanol. Antibacterial activity test using the *Optical Density* method at max 600 nm. The result of phytochemical screening from ethanol extract showed that there were flavonoid compounds, saponins, tannins, phenols and triterpenoids. The result of antibacterial activity test showed that the optimum activity occurs at incubation time of 3 hours with percentase inhibition percentase i.e. 59.03 %.

Keywords: antibacterial activity, nyamplung leaves, secondary metabolite compound

PENDAHULUAN

Negara Indonesia merupakan salah satu negara tropis yang memiliki keanekaragaman flora hayati yang dapat dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional. Salah satunya berasal dari genus *Calophyllum*. Genus *Calophyllum* merupakan tumbuhan

tropis yang terdiri dari 180 - 200 spesies berbeda yang terkenal dengan senyawa bioaktif (Su *et al.*, 2008). Salah satu spesies dari genus *Calophyllum* adalah *Calophyllum inophyllum* Linn. yang lebih dikenal dengan nama nyamplung.

Penelitian komponen kimia dari tumbuhan nyamplung telah banyak dilakukan di luar negeri namun penelitian mengenai kandungan kimia tumbuhan nyamplung yang tumbuh di Indonesia belum banyak dilaporkan padahal tumbuhan ini banyak tumbuh di berbagai daerah di Indonesia, seperti: Sumatera, Jawa, Nusa Tenggara, Sulawesi, dan Bali (Heyne, 1987). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diluar negeri dari bagian daun, akar, dan kayu bila diisolasi terdapat senyawa yang mempunyai aktivitas biologi seperti anti HIV (Patil *et al.*, 1993), anti kanker (Yimdjo *et al.*, 2004), anti malaria (Hay *et al.*, 2004), anti bakteri (Cottiglia *et al.*, 2004), dan anti tumor (Itoigawa *et al.*, 2001).

Bakteri *Escherichia coli* ialah sebuah bakteri gram negatif yang bersifat aerobik dan anaerobik fakultatif dan sering dijumpai di dalam usus bagian bawah. Penyebaran *Escherichia coli* adalah melalui air yang tercemar tinja atau air seni orang yang memiliki infeksi pada pencernaannya. Mikroorganisme dalam spesimen tinja diperkirakan 10^{12} organisme per gram (Irianto, 2006). Infeksi yang timbul pada pencernaan akibat serangan *Escherichia coli* pada dinding usus menyebabkan terjadinya diare akibat penyerapan air pada dinding usus berkurang. Masyarakat Indonesia sudah mengenal dan menggunakan tanaman untuk mengobati berbagai macam infeksi yang disebabkan oleh mikroba. Oleh sebab itu, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi senyawa bahan alam dari daun nyamplung yang kemudian isolatnya akan diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan sebagai berikut: serangkaian alat soklet, *rotary evaporator vacuum*, neraca analit, *hotplate*, *autoclave*, *incubator shaker*, Spektrofotometer UV-Vis, statif dan klem, jarum ose, spatula logam, botol vial, tabung reaksi, lemari pendingin dan peralatan gelas.

Bahan yang digunakan: daun nyamplung, kertas saring, karet gelang, tisu, aluminium foil, kapas, plastik wrap, etanol p.a, Si-gel F₂₅₄, heksana, etil asetat, kloroform, asam asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, HCl 2 M, reagen Dragendorf, reagen Mayer, reagen Wagner, NH₃ 10 %, metanol 50 %, FeCl_{3(aq)}, NaCl_(s), Mg_(s), Luria Bertani Agar, Miller

(Merck 37 g/L), Luria Bertani Broth, Miller (Merck 25 g/L), bakteri *Eschericia coli* ATCC 25922, akuades, *amoxycilin*.

Ekstraksi Sampel Daun Nyamplung

Sebanyak 50 gram serbuk kering daun *Callophyllum inophyllum* Linn._yang telah dideterminasi sebelumnya di Laboratorium Biologi FMIPA UNS diisolasi dengan alat soklet menggunakan 250 mL etanol selama 20 siklus. Selanjutnya hasil ekstrak dievaporasi sampai dihasilkan ekstrak pekat. Pada ekstrak etanol dilakukan KLT untuk mengetahui jumlah senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol dilihat dari jumlah spot yang terbentuk menggunakan eluen heksana : etil asetat (6 : 4), analisis ini untuk memprediksikan jumlah senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol daun nyamplung.

Skrining Fitokimia (Uji Tabung)

Pemeriksaan kualitatif penggolongan senyawa dilakukan dengan skrining fitokimia menggunakan uji tabung (Indrayani *et al.*, 2006). Pengujian yang dilakukan meliputi pengujian golongan steroid, triterpenoid, alkaloid, kumarin, flavonoid, tannin, saponin.

a. Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak daun nyamplung diuapkan sampai kering, kemudian residu yang dihasilkan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya campuran ini ditetesi dengan 1 - 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan munculnya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

b. Alkaloid

Ekstrak daun nyamplung diuapkan sampai kering, kemudian residu ditambah 1,5 - 2 % HCl dan larutan dibagi dalam tiga tabung. Tabung 1 ditambah 0,5 mL larutan asam encer sebagai pembanding, tabung 2 ditambah 2 - 3 tetes reagensia Dragendorff, dan tabung 3 ditambah 2 - 3 tetes reagensia Mayer. Jika tabung 2 terbentuk endapan jingga dan pada tabung 3 terbentuk endapan kekuning-kuningan menunjukkan adanya alkaloid.

c. Kumarin

Ekstrak daun nyamplung diuapkan sampai kering, kemudian dilarutkan dalam air panas, setelah dingin, larutan dibagi dalam 2 tabung reaksi, yaitu tabung 1 sebagai blanko,

dan tabung 2 ditambah 0,5 mL NH₃ 10 %. Adanya pijaran yang kuat di bawah sinar UV menunjukkan adanya kumarin dan turunannya.

d. Flavonoid

Ekstrak daun nyamplung diuapkan sampai kering, kemudian dilarutkan dalam 1 - 2 mL metanol panas 50 %. Setelah itu ditambahkan logam Mg dan 4 - 5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

e. Tanin dan Fenol

Ekstrak daun nyamplung dilarutkan dalam 1 - 2 mL air dan ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃, timbulnya warna biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin galat dan jika warnanya hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa tanin katekol.

f. Saponin

Ekstrak daun nyamplung dalam tabung reaksi ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 5 menit. Adanya busa yang dapat bertahan selama 30 menit menunjukkan adanya senyawa saponin.

Uji Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode OD_{max} 600 nm (Sezonov *et al.*, 2007 dan Matlock *et al.*, 2011) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, meliputi 3 tahap sebagai berikut:

a. Persiapan Media

Media pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang digunakan adalah Luria Bertani (LB) (Lahmer *et al.*, 2012; Matlock *et al.*, 2011; Sezonov *et al.*, 2007 dan Tang *et al.*, 2010). Sterilisasi alat dan bahan dilakukan pada suhu 121 °C selama 15 menit menggunakan autoklaf. Hal tersebut bertujuan untuk membunuh mikroorganisme yang terdapat pada alat dan bahan yang dapat mengganggu pengujian. Pembuatan Media LB Broth 2,5 % (b/v) dengan melarutkan 1,25 gram LB Broth ke dalam 50 mL akuades, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

b. Persiapan Inokulum.

Sebanyak 1 ose bakteri uji ditumbuhkan dalam LB Broth, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 - 24 jam dengan kecepatan 150 rpm (Lahmer *et al.*, 2012 dan Tang *et al.*, 2010).

c. Uji Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri adalah metode OD_{max} 600 nm (Sezonov *et al.*, 2007 dan Matlock *et al.*, 2011). Sebanyak 0,05 gram sampel ekstrak etanol dilarutkan ke dalam 40 mL akuades dan ditambahkan 1 gram LB Broth 2,5 % (b/v), kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Campuran yang terbentuk didinginkan dan ditambahkan 0,5 mL inokulum bakteri 1 % hasil inkubasi. Sampel uji diinkubasi pada 37 °C dengan kecepatan 150 rpm (Lahmer *et al.*, 2012).

Pengujian antibakteri dilakukan dengan mengukur adsorbansi larutan sampel jam ke-0, 3, 6, 9, 12, dan 24 menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{max} 600 nm secara duplo (Sezonov *et al.*, 2007 dan Matlock *et al.*, 2011).

PEMBAHASAN

Ekstraksi Daun *Callophyllum inophyllum* Linn.

Hasil ekstraksi soklet 50 gram daun nyamplung dengan 200 mL etanol diperoleh ekstrak encer berwarna hijau tua. Ekstraksi ini dilakukan untuk mengambil komponen kimia dari sampel daun nyamplung. Ekstrak etanol ini selanjutnya digunakan untuk analisis berikutnya. Hasil ekstraksi daun nyamplung dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Daun Nyamplung dengan Metode Sokletasi

Bahan	Berat (gram)	Volume Etanol p.a (mL)	Warna
Daun Nyamplung	50	200	Hijau tua

Skrining Fitokimia (Uji Tabung)

Hasil uji fitokimia terhadap ekstrak daun nyamplung menunjukkan bahwa dalam ekstrak tersebut terdapat beberapa senyawa metabolit sekunder yang disajikan pada Tabel 2. Pengamatan kandungan senyawa kimia pada ekstrak daun nyamplung dilakukan berdasarkan perubahan hasil reaksi. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun nyamplung mengandung senyawa triterpenoid, flavonoid, saponin, dan tannin.

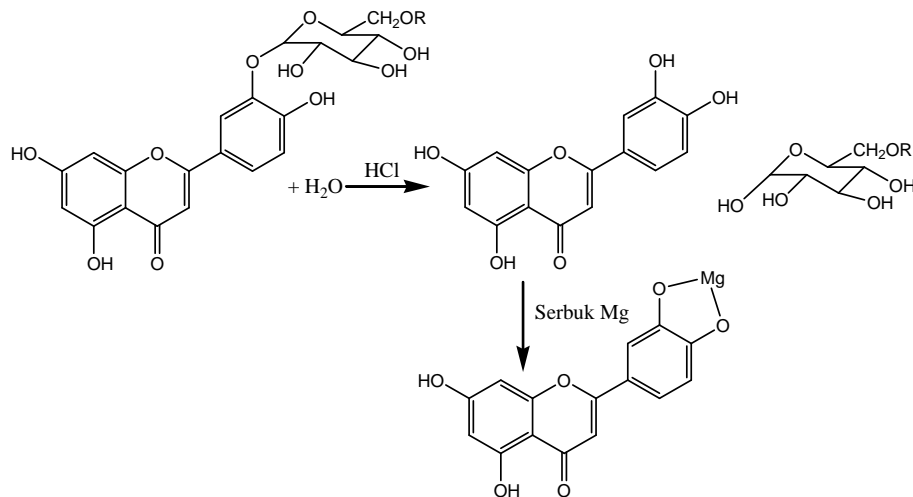
Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia pada Ekstrak Etanol Daun Nyamplung

Kandungan Kimia	Metode Pengujian	Hasil	Keterangan
Alkaloid	+ Meyer	Tidak ada endapan	-
	+ Wagner	Tidak ada endapan	-
	+ Dragendorf	Tidak ada endapan	-
Saponin	+ Aquades	Membentuk buih	+
Flavonoid	+ Metanol panas 50 %	Jingga	+
	+ Mg _(s)		
	+ HCl pekat		
Tanin dan Fenol	+ FeCl ₃ (aq)	Hijau kehitaman	+ (tanin katekol)
Steroid dan Triterpenoid	+ Kloroform	Coklat kehitaman dan cincin kecoklatan	+ (triterpenoid)
	+ as. asetat anhidrat		
	+ H ₂ SO ₄ pekat		
Kumarin	+ Aquades + NH ₃ 10 %	Tidak muncul pijaran kuat di lampu UV	-

Keterangan : (+) = Ada, (-) = Tidak ada.

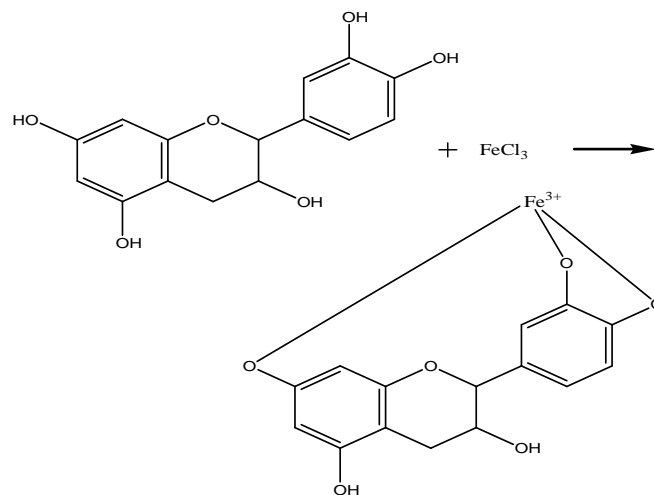
Uji steroid dan triterpenoid yang menggunakan metode Lieberman-buchard. Ekstrak dilarutkan dalam kloroform lalu ditambahkan pereaksi Lieberman-buchard (asam asetat anhidrat-H₂SO₄ pekat) menunjukkan hasil positif triterpenoid pada ekstrak kasar etanol dengan terbentuknya cincin kecoklatan. Perbedaan warna larutan yang terbentuk antara steroid dan triterpenoid disebabkan gugus yang dimiliki keduanya berbeda pada atom C yang keempat (Marliana *and* Saleh, 2011).

Dari hasil percobaan uji flavonoid penambahan HCl pekat dan logam Mg menghasilkan warna jingga, hal ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak mengandung flavonoid. Reaksi yang terjadi antara logam Mg dan HCl pekat adalah sebagai berikut reduksi dengan Mg dan HCl pekat ini menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, dan flavanonol. Mekanisme uji flavonoid dengan logam Mg dan HCl pekat dapat dilihat pada Gambar 1.



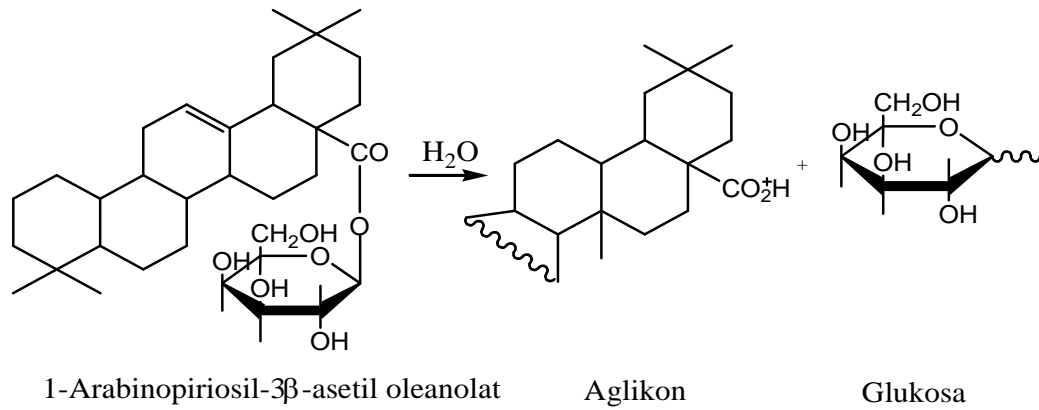
Gambar 1. Mekanisme Reaksi Mg dengan HCl (Harborne, 1987).

Pada uji tannin dan fenol yang menggunakan larutan FeCl_3 1 % menunjukkan hasil positif pada ekstrak kasar dengan terbentuknya warna hijau kehitaman hingga hitam pekat. Fe dapat mengikat 6 pasang electron bebas. Ion Fe^{3+} dalam pembentukan senyawa kompleks akan terhibridisasi membentuk hibridisasi d^2sp^3 , sehingga akan terisi oleh 6 pasang electron bebas atom O pada tanin. Kestabilan dapat tercapai jika tolakan antara ligan minimal pada 3 tanin (Dewi, 2004). Mekanisme reaksi uji tannin dengan FeCl_3 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Penambahan FeCl_3 (Dewi, 2004).

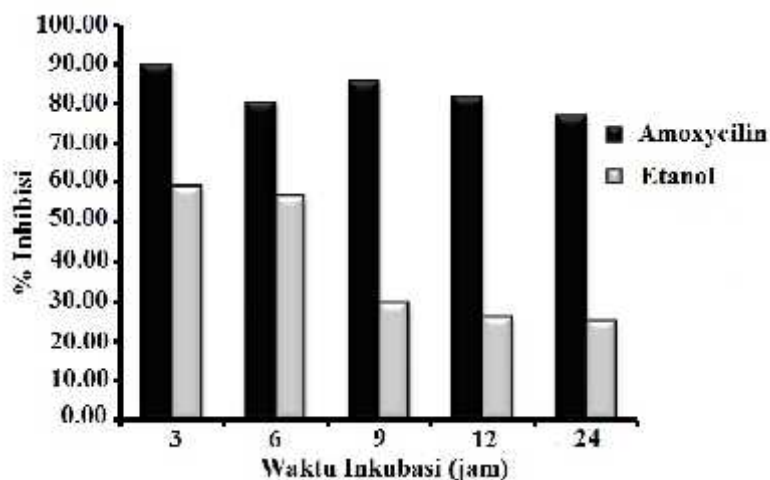
Pada uji saponin timbulnya busa pada uji Forth menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana, 2005). Mekanisme reaksi hidrolisis saponin dalam air dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air (Marliana, 2005).

Uji Antibakteri

Metode pengujian yang digunakan adalah metode dilusi OD_{max} 600 nm dengan waktu inkubasi 0, 3, 6, 9, 12, dan 24 jam. Bakteri yang digunakan yaitu *Escherichia coli*. Uji antibakteri ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan beberapa waktu inkubasi. Pengujian juga dilakukan pada kontrol negatif yang berupa pelarut dari sampel yaitu akuades dan juga kontrol positif yaitu *amoxycilin*. Jumlah sel bakteri dapat diukur dengan cara mengetahui kekeruhan (turbiditas) kultur. Semakin keruh suatu kultur, semakin banyak jumlahnya. Cahaya yang dipancarkan pada spektrofotometer akan mengenai sel sehingga sebagian cahaya akan diserap dan sebagian diteruskan. Besarnya cahaya dalam spektrofotometer yang diserap oleh sel dalam kuvet dihitung sebagai nilai absorbansi. Dari data absorbansi dihitung persentase daya hambat (% inhibisi) terhadap bakteri pada masing-masing sampel. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun nyamplung terhadap bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode OD_{max} 600 nm dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Persentase Inhibisi Ekstrak Etanol Daun Nyamplung terhadap *E.coli*.

Hasil pengujian menunjukkan waktu inkubasi untuk daya hambat antibakteri yang paling optimum adalah pada waktu 3 jam. Pada waktu inkubasi optimum ini persentase daya hambat ekstrak etanol pada bakteri *Escherichia coli* sebesar 59,03 %. Persentase inhibisi yang semakin menurun dari ekstrak etanol menunjukkan masih terdapat pertumbuhan bakteri yang berarti komponen kimia dalam ekstrak belum dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun nyamplung hanya memiliki aktivitas bakteriostatik yaitu hanya menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* namun tidak dapat membunuh (bakterisidal) bakteri *Escherichia coli*.

Kinerja senyawa antibakteri dipengaruhi oleh struktur dinding sel bakteri (Jawetz *et al.*, 2005). Pada penelitian ini, pelarut yang digunakan untuk isolasi adalah etanol yang bersifat polar sehingga senyawa-senyawa yang bersifat polar banyak yang ikut tertarik dalam ekstrak. Hal ini menyebabkan aktivitas antibakteri yang diinginkan tidak optimal karena bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif lebih banyak mengandung lipid, sedikit peptidoglikan, membran luar berupa bilayer (berfungsi sebagai pertahanan selektif senyawa-senyawa yang keluar atau masuk sel dan menyebabkan efek toksik). Membran luar terdiri dari fosfolipid yang tersusun atas lipid A, yang bersifat nonpolar. Sedangkan senyawa antibakteri dalam daun nyamplung seperti flavonoid dan saponin merupakan senyawa yang bersifat polar sehingga lebih sulit menembus lapisan lipid yang nonpolar untuk masuk ke dalam sel. Hal ini yang menyebabkan aktivitas penghambatan pada bakteri gram negatif sangat lemah.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun nyamplung mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, saponin, triterpenoid, dan tanin. Potensi aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun nyamplung yaitu tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) karena berdasarkan grafik nilai persentase inhibisi yang diberikan semakin menurun bila dibandingkan dengan *amoxicilin*. Aktivitas antibakteri terbesar terjadi pada waktu inkubasi 3 jam dengan persentase inhibisi yaitu 59,03 %.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada DIKTI yang telah membiayai penelitian Hibah PKM-P 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Cottiglia, F., Dhanopal, B., Sticher, O., Helann, J., 2004, New Chromanone Acids with Anti Bacterial Activity from *Calophyllum brasiliense*, *Journal Natural Product*, vol. 67, pp. 537-541.
- Dewi, R. C., 2004, *Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Buah Pare Belut (Trichosanthes anguina L.)*, Skripsi, Fakultas MIPA UNS, Surakarta.
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Penerbit ITB, Bandung.
- Hay, A.E., Helesbeux, J. J., Duval, O., Labaied, M., Grellier, P., 2004, Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*, *Journal Phytochemistry*, vol. 75, pp. 3077-3085.
- Heyne, K., 1987. *Tumbuhan berguna Indonesia*, Jilid 3, Badan Litbang Kehutanan, Jakarta, pp. 1375-1378.
- Indrayani, L., Soetjipto, H., dan Sihasale L., 2006, Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach, *Berkeley Penel Hayati*, vol 12, pp. 57-61.
- Irianto, K., 2006, *Mikrobiologi: Menguak Dunia Mikroorganisme*, CV. Yrama Widya, Bandung.
- Itoigawa, M.C., Ito, C., Tan, H.T.W., Kuchide, M., Tokuda, H., Nishino, H., Furukawa, H., 2001, Cancer cheopreventive agents, 4-phenylcoumarins from *Calophyllum inophyllum*, *Journal Natural Product*, vol. 169, pp. 15-19.
- Jawetz, E. J., Melnick, L., Adelberg, E. A., 2005, *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*, Terjemahan Huriati dan Hartanto, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Surakarta.
- Lahmer, R.A., Williams, A.P., Townsend, S., Baker, S., Jones, D.L., 2012, Antibacterial Action of Chitosan-Arginine against *Escherichia coli* O157 in Chicken Juice, *Food Control*, vol. 26, pp. 206-211.
- Marliana, S. D., Suryanti, V., Suryono, 2005, Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimis Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol, *Biofarmasi*, vol. 3, no. 1, pp. 26-31.
- Marliana, E., Saleh, C., 2011, Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi heksana, Etil Asetat dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenari siceraria* (Moliana) Standl), *Jurnal Kimia Mulawarman*, vol. 8, no. 2, pp. 63-69.
- Matlock, B.C., Beringer, R.W., Ash, D.L., Page, A.F., Allen, M.W., Scientific, T.F., Walmington., D.E. USA., Scientific, T.F., Madison, W.I. USA, 2011, Differences in Bacterial Optical Density Measurements between Spectrophotometers, *Thermoscientific*.
- Patil, A. D., Freyer, A. J., Eggleston, D. S., Haltiwanger, R. C., Bean, M. F., Taylor, P. B., Caranfa, M. J., Breen, A. L., Bartus, H. R., Johnson, R. K., Hertzberg, R. P., Westley, J. W., 1993, The Inophyllums, Novel Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase Isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn., *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 36, no. 26, pp. 4131-4138.
- Sezonov, G., Petit, D.J., D'Ari, R., 2007, *Escherechia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth, *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 23, pp. 8746-8749.

- Su, X.H., Zhang, M.L., Li, L.G., Huo, C.H., Gu, Y.C., Shi, Q. W., 2008, Chemical Constituent of the Plants of the Genus *Calophyllum*, *Chemistry & Biodiversity*, vol. 5, pp. 2579-2608.
- Tang, H., Zhang, P., Kieft, T.L., Ryan, S.J., Baker, S.M., Wiesmann, W.P., dan Rogelj, S., 2010, Antibacterial Action of a Novel Functionalized Chitosan-Arginine Against Gram-Negative Bacteria, *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 2562-2571.
- Yimdjo, M.C., Azebaze, A.G., Nkengfack, A.E., Meyer, A.M., Bodo, B., Fomum, Z. T., 2004, Antimicrobial and Cytotoxic Agents from *Calophyllum inophyllum*, *Phytochemistry*, vol. 65, pp. 2789-2795.