

Antibacterial substances of sponges, *Agelas tubulata* and *Phyllospongia* sp., from Manado Bay, against the growth of several bacterial strains

Senyawa antibakteri spons, *Agelas tubulata* dan *Phyllospongia* sp., dari Perairan Teluk Manado, terhadap pertumbuhan beberapa strain bakteri

Nani Ingrid J. Undap^{1*}, Deiske A. Sumilat², and Robert Bara²

¹Program Studi Magister Ilmu Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Jl. Kampus Unsrat Kleak, Manado 95115, Sulawesi Utara, Indonesia.

²Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Jl. Kampus Unsrat Bahu, Manado 95115, Sulawesi Utara, Indonesia.

*E-mail: ingrid_undap@yahoo.com

Abstract: *Agelas tubulata* and *Phyllospongia* sp. are marine sponge that contain active compounds that have potential to be antibacterial, anticancer and antifungal which have not been used. This study was aimed to examine the sponge extracts which inhibit bacterial growth, i.e. *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *S. saprophyticus* and to analyze the active fraction of the antibacterial component using bio-autographic method. *Agelas tubulata* and *Phyllospongia* sp. were collected from Manado Bay and method used in the study was Agar Diffusion Method. Results showed that *A. tubulata* and *Phyllospongia* sp. extract had antibacterial activity against all 5 bacteria tested. *A. tubulata* extract had inhibition zone with broader spectrum than that of *Phyllospongia* sp. extract, while *Phyllospongia* sp. has specificity for *P. mirabilis*.

Keywords: *Agelas tubulata*; *Phyllospongia* sp.; extract of sponges; antibacterial.

Abstrak: *Agelas tubulata* dan *Phyllospongia* sp. merupakan spesies spons laut yang mengandung senyawa aktif yang berpotensi antibakteri, antikanker dan antijamur yang belum banyak dimanfaatkan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji ekstrak spons laut yang menghambat pertumbuhan 5 bakteri yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus saprophyticus* dan menganalisis fraksi aktif antibakteri melalui teknik bioautografi. Spesies spons laut *A. tubulata* dan *Phyllospongia* sp. diambil dari Perairan Pantai Malalayang Manado. Metode yang digunakan yaitu metode difusi agar. Hasil dari penelitian ini, yaitu ekstrak *A. tubulata* dan *Phyllospongia* sp. mempunyai aktivitas terhadap 5 bakteri uji. Ekstrak *A. tubulata* memiliki daya hambat dengan spektrum yang lebih luas dibandingkan ekstrak *Phyllospongia* sp. sedangkan ekstrak *Phyllospongia* sp. memiliki spesifitas terhadap bakteri *P. mirabilis*.

Kata-kata kunci: *Agelas tubulata*; *Phyllospongia* sp.; ekstrak spons; antibakteri.

PENDAHULUAN

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa biota laut memiliki potensi yang sangat besar dalam menghasilkan senyawa-senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai bahan baku obat. Sejak tahun 1980-an, perhatian dunia pengobatan mulai terarah kepada berbagai macam biota laut sebagai sumber daya yang sangat potensial. Beberapa biota laut yang diketahui menghasilkan senyawa aktif antara lain spons, moluska, bryozoa, tunikata, dan lain-lain (Blunt, 2012).

Salah satu jenis organisme bentik yang berpotensi cukup besar dan berpeluang mengan-

andung senyawa aktif adalah spons. Spons merupakan hewan laut yang penyebarannya sangat luas di perairan laut sampai pada kedalaman 50 meter. Sejauh ini tercatat sekitar 15.000 spesies spons laut di seluruh dunia (Denning, 2006).

Spons (Porifera), sering disebut juga sebagai bunga karang, merupakan hewan primitif yang multiseluler, oleh karena itu sering disebut sebagai *metazoa*. Beberapa jenis tidak mempunyai mulut dan saluran cerna atau tidak mempunyai sistem organ yang lengkap. Badannya berbentuk pori yang berisikan satu atau lebih kavitasi berflagella yang dinamakan *choanocytes*. Hewan ini termasuk organisme yang unik karena kehidupannya bersama

dengan mikroba yang saling bergantung satu dengan yang lain atau simbiose positif (Rompas, 2011). Diduga mikroorganisme simbiosis ini terlibat dalam biosintesis senyawa-senyawa aktif yang terdapat dalam spons ini (Proksch, 2002).

MATERIAL DAN METODA

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan metode eksperimental. Spons, yang diambil dari perairan Pantai Malalayang, Manado, Sulawesi Utara, di kedalaman 5-16 m, dipotong kecil-kecil berbentuk kubus dan ekstraksi dengan cara maserasi dalam larutan etanol 95 %.

Pembuatan media *Brain Heart Infusion* (BHI)

Media BHI ditimbang sebanyak 37 gram, dilarutkan dalam 1 liter akuades dalam tabung erlenmeyer, diaduk sampai homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Media disterilisasi di dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit; selanjutnya, dituang dalam tabung reaksi sebanyak 7 ml dan ditutup dengan aluminium foil. Media cair BHI siap digunakan sebagai media kultur bakteri (Ortez, 2005).

Pembuatan Media Peremajaan Bakteri

Nutrient Agar (NA), sebanyak 23 gram, dilarutkan dengan 1 liter akuades di dalam tabung erlenmeyer, dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*, dan dituang ke dalam tabung reaksi steril, kemudian ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan di dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah steril dibiarkan pada suhu ruangan selama 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°.

Pembuatan Lapisan Pembenuhan *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

Mueller-Hinton Agar (MHA) ditimbang sebanyak 38 gram dan dilarutkan dengan 1 liter akuades. Media disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, media dimasukkan dalam cawan petri sebanyak 10 ml dan dibiarkan hingga mengeras. Pada lapisan berikutnya, dituang media yang sama sebanyak 20 ml. Sedotan dengan diameter 6 mm, yang telah disterilisasi sebelumnya, diletakkan tegak lurus dengan jarak yang seragam satu sama lain. Setelah media agar mengeras sedotan diangkat sehingga terbentuk 5 buah sumur.

Peremajaan Bakteri dan Penanaman Pada Lapisan Pembenuhan

Stok bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Staphylococcus saprophyticus* diperoleh dari Laboratorium Riset Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Sam Ratulangi (UNSRAT), Manado. Bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose steril, kemudian ditanamkan pada media agar miring, dan menggoresnya dengan cara zig-zag. Bakteri yang telah digores pada media agar diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1 × 24 jam, selanjutnya diambil koloninya dari media agar miring dengan menggunakan jarum ose steril. Kekeruhan bakteri dalam BHI distandarisasi dengan larutan Mc Farland. Koloni yang diambil dimasukkan ke dalam media BHI. Lidi kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri hingga basah. Lidi kapas diperas dengan menekan pada dinding tabung reaksi bagian dalam, kemudian digores merata pada media MHA (Ortez, 2005).

Pembuatan Kontrol Positif

Larutan kontrol positif dibuat dengan sediaan antibiotik *Chloramphenicol* 250 mg, kemudian dilarutkan dengan akuades 100 ml hingga homogen menggunakan *magnetic stirrer*.

Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu pelarut etanol 95%. Digunakannya pelarut etanol sebagai kontrol negatif karena tidak memberikan pengaruh terhadap aktivitas daya hambat.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Dalam penelitian ini, metode yang digunakan yaitu metode Kirby-Bauer yang dimodifikasi oleh Nainggolan dalam Posangi dan Bara (2014) dengan menggunakan sumuran. Sumur yang berbeda diisi dengan larutan ekstrak spons *A. tubulata* dan *Phyllospongia* sp. sebanyak 100 µl dengan konsentrasi larutan ekstrak 0,3 g/ml yang dilarutkan dengan etanol 95 %; sumur, selanjutnya, diisi dengan kontrol positif, yaitu *chloramphenicol* yang sudah dilarutkan dengan akuades dan kontrol negatif etanol 95 % serta dilakukan pengulangan. Setelah itu, *petri dish* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Uji Kandungan Senyawa dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak *A. tubulata* yang sudah dievaporasi dilarutkan kembali dengan pelarut yang sesuai,

yaitu etil asetat:etanol:air (30:5:1); sedangkan ekstrak *Phyllospongia* sp. dilarutkan dengan kloroform:etanol (8:2). Sebanyak 2 µl larutan sampel ditotolkan pada fase diam, yaitu silica gel GF₂₅₄, dan dielusi dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1). Plat KLT dikering-anginkan, kemudian pemisahan diamati di bawah lampu Ultra Violet 254 nm.

Teknik Bioautografi

Teknik bioautografi digunakan dalam penelitian ini; hal ini dilakukan untuk mendeteksi bercak pada kromatogram dari hasil kromatografi lapis tipis yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Bioautografi dalam uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai metode, yaitu bioautografi kontak, bioautografi *agar overlay* dan bioautografi langsung (Choma, 2005). Pada penelitian ini, digunakan teknik bioautografi kontak yang dilakukan dengan meletakkan lempengan kromatogram hasil elusi dari ekstrak yang diuji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Adanya aktivitas antibakteri dari senyawa uji ditandai dengan adanya zona bening pada senyawa aktif.

Sebanyak 2 µl ditotolkan pada plat KLT, dielusi dalam bejana dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1). Plat KLT yang telah dielusi ditempelkan pada media MHA yang telah diinokulasi dengan 200 µl bakteri; dидiamkan selama 1 jam, diberi tanda pada bagian bawahnya, kemudian plat diangkat. Kemudian, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bila ada bercak pada

kromatogram yang memiliki aktivitas antibakteri, maka dengan cara difusi akan terbentuk zona bening yang merupakan zona hambat. Kemudian Plat KLT yang ada dipotong dan dibawa ke Laboratorium Analisis Farmasi Fakultas MIPA UNSRAT untuk diuji dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

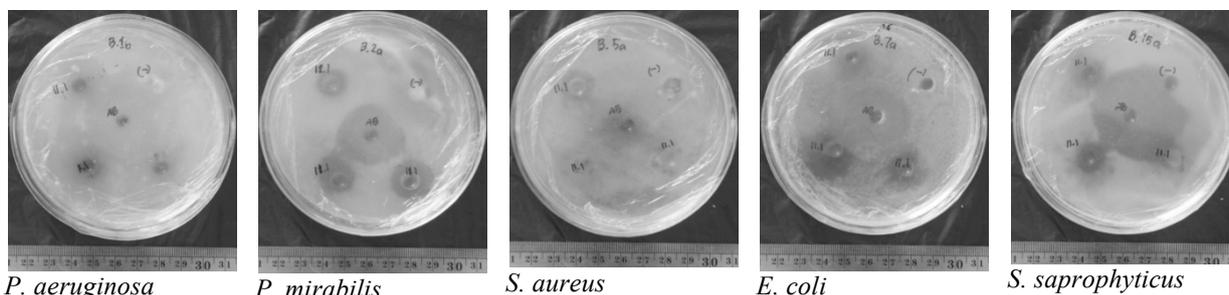
Isolat yang ada dikeluarkan dan dilarutkan dalam metanol kemudian di vortex dan disentrifus di mana terbentuk endapan dan supernatan. Supernatan dituang ke tabung reaksi yang lain. Supernatan yang ada ditambahkan lagi metanol. Pengulangan sampai 3 kali. Kemudian supernatan yang ada diuji pada spektrofotometer UV-Vis.

Pengamatan dan Pengukuran

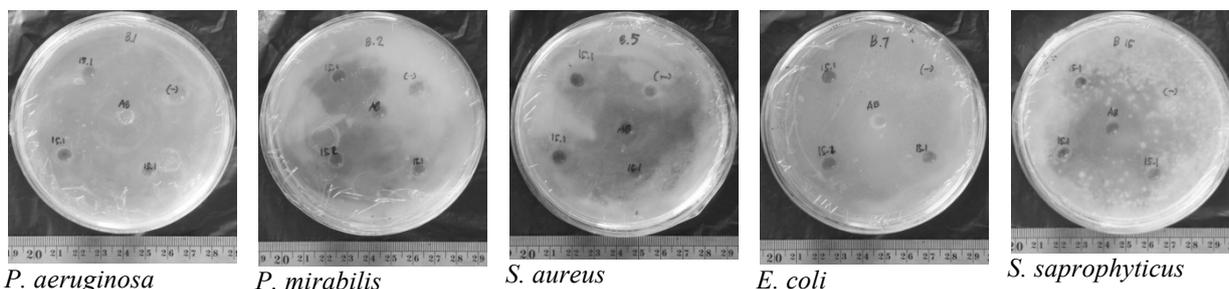
Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dan 48 jam masa inkubasi. Zona bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan luas zona hambat. Berdasarkan penggolongan Davis and Stout (1971), zona hambat dikategorikan sebagai kekuatan daya antibakteri. Zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur diukur diameternya dengan menggunakan mistar berskala dalam satuan milimeter (mm).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, pengujian daya hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yang dihasilkan pada media yang mengandung 5



Gambar 1. Zona hambat Ekstrak spon *Agelas tubulata* pada pengamatan 1×24 Jam terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *E. coli* dan *S. saprophyticus*.



Gambar 2. Zona hambat ekstrak spons *Phyllospongia* sp. pada pengamatan 1×24 Jam terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *E.coli* dan *S. saprophyticus*.

bakteri, yaitu *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *E. coli* dan *S. saprophyticus* setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengujian daya hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yang dihasilkan pada media yang mengandung 5 bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini bersifat Gram positif dan Gram negatif. Untuk *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. coli* bersifat Gram negatif dan untuk *S. aureus* dan *S. saprophyticus* bersifat Gram positif. Penggunaan bakteri Gram negatif pada penelitian ini dengan alasan karena sejauh ini pengendalian infeksi Gram negatif sering kali menjadi kendala dalam dunia kedokteran modern. Hal ini diakibatkan oleh karakteristik bakteri kelompok Gram negatif yang memiliki dinding peptidoglikan yang cukup padat dan kompak sehingga menghambat proses internalisasi senyawa obat untuk mampu mempengaruhi mekanisme seluler dari bakteri; di samping itu, karena adanya *efflux-pump mechanism*, yaitu suatu mekanisme untuk mengeluarkan senyawa-senyawa yang tidak dibutuhkan dalam proses-proses biotransformasi seluler bakteri melalui sistem sekresi mereka (Poole, 2007; Posangi dan Bara,

2014).

Ekstrak *A. tubulata* dan *Phyllospongia* sp. memiliki daya hambat terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *E. coli* dan *S. saprophyticus* yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Gambar 1 dan Gambar 2).

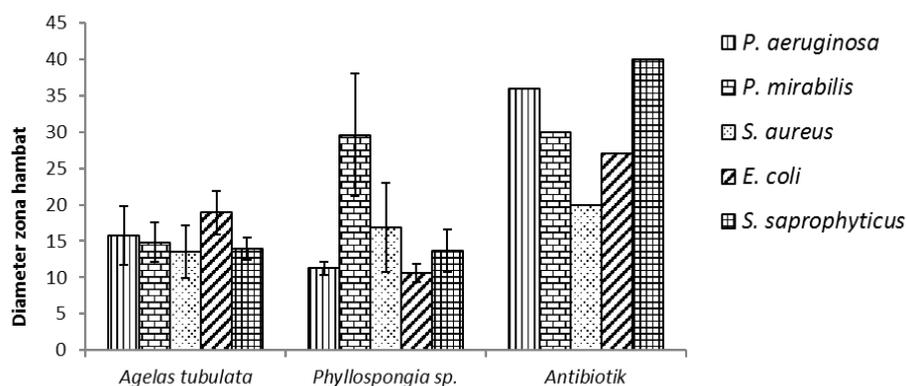
Data yang diperlihatkan pada Tabel 1 menunjukkan, bahwa zona hambat ekstrak *A. tubulata* berbeda-beda terhadap kelima jenis bakteri uji. Zona hambat yang dibentuk dari ekstrak tersebut terhadap bakteri *P. aeruginosa* berkisar 15,75 mm, *P. mirabilis* berkisar 14,83 mm, *S. aureus* berkisar 13,50, *E. coli* berkisar 18,92 mm, dan *S. saprophyticus* berkisar 14,00 mm. Selanjutnya, pengukuran zona hambat pada Tabel 1 dibuat dalam bentuk diagram yang disajikan seperti pada Gambar 3. Nampak, ekstrak *A. tubulata* memiliki daya hambat dengan spektrum yang lebih luas dibandingkan ekstrak *Phyllospongia* sp.

Nilai rerata pengukuran zona hambat ekstrak *Phyllospongia* sp. terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *E. coli* dan *S. saprophyticus* disajikan dalam Tabel 1.

Data yang diperlihatkan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa zona hambat ekstrak *Phyllospongia* sp. berbeda-beda terhadap kelima

Tabel 1. Rerata diameter zona hambat ekstrak spons *Agelas tubulata* dan *Phyllospongia* sp. pada pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli* dan *Staphylococcus saprophyticus*.

Spesis Spons	Bakteri				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. saprophyticus</i>
<i>Agelas tubulata</i>	15,75±4,02	14,83±2,73	13,5±3,61	18,92±2,99	14,00±1,52
<i>Phyllospongia</i> sp.	11,25±0,92	29,58±8,41	16,92±6,14	10,58±1,26	13,67±2,86
Antibiotik	36,00	30,00	20,00	57,25	40,00



Gambar 5. Grafik histogram rerata diameter zona hambat ekstrak spons *Agelas tubulata* dan *Phyllospongia* sp. pada pengamatan 1×24 jam terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *E. coli* dan *S. saprophyticus*.

jenis bakteri uji. Zona hambat yang dibentuk dari ekstrak tersebut terhadap bakteri *P. aeruginosa* berkisar 11,25 mm, terhadap bakteri *P. mirabilis* berkisar 29,58 mm, terhadap *S. aureus* berkisar 16,92 mm, terhadap *E. coli* berkisar 10,58 mm, terhadap *S. saprophyticus* berkisar 13,67 mm. Selanjutnya, pengukuran zona hambat pada Tabel 1 dibuat dalam bentuk diagram yang disajikan seperti pada Gambar 3. Nampak, ekstrak *Phyllospongia* sp. lebih spesifik membunuh bakteri *P. mirabilis*.

Uji Bioautografi

Berdasarkan hasil uji bioautografi senyawa aktif yang terdapat pada *A. tubulata* memiliki nilai Rf 0,1 dengan menggunakan fase gerak etil asetat:etanol:air (30:5:1). Eluen ini lebih bersifat polar dibandingkan dengan eluen yang digunakan pada ekstrak *Phyllospongia* sp. yang menggunakan kloroform:etanol (9:1). Senyawa aktif pada ekstrak *Phyllospongia* sp. memiliki nilai Rf 0,65. Hasil dari uji bioautografi ini dilanjutkan dengan uji Spektrofotometer UV-Vis.

Uji Spektrofotometer

Hasil bercak pada plat KLT (Gambar 4) yang memiliki aktifitas antibakteri dipotong dan dilarutkan kembali dengan metanol selanjutnya dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis (Gambar 5). Gambar 5 menunjukkan, bahwa senyawa antibakteri yang terdapat pada ekstrak *A. tubulata* memiliki serapan UV maksimum pada panjang gelombang 275 nm; sedangkan senyawa antibakteri pada ekstrak *Phyllospongia* sp. memiliki serapan UV maksimum pada panjang gelombang 285 nm.

Kisaran panjang gelombang senyawa antibakteri pada kedua spons berada pada 270-285 nm. Hal ini memberikan bukti, bahwa kedua senyawa aktif yang terdapat pada spons *A. tubulata* dan *Phyllospongia* sp. memiliki gugus fungsi siklo heksana. Senyawa aktif dengan gugus fungsi ini biasanya terdapat di alam pada struktur senyawa terpenoid dan flavonoid dengan aktifitas antibakteri yang kuat (Manasa, 2014; Bara et al., 2013; Walker

et al., 1952; Pinheiro and Goncalo, 2012; Tyukavkina et al., 1970; Bara et al., 2013; Taleb-Contini et al., 2003 dan Silverstein et al., 2005).

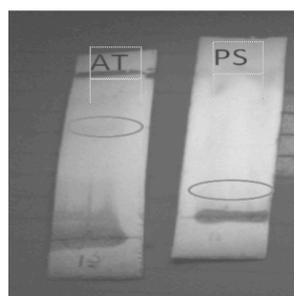
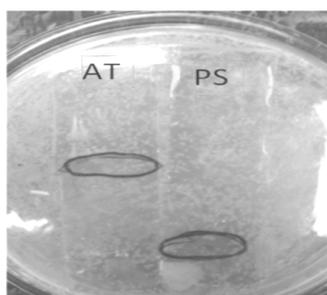
KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

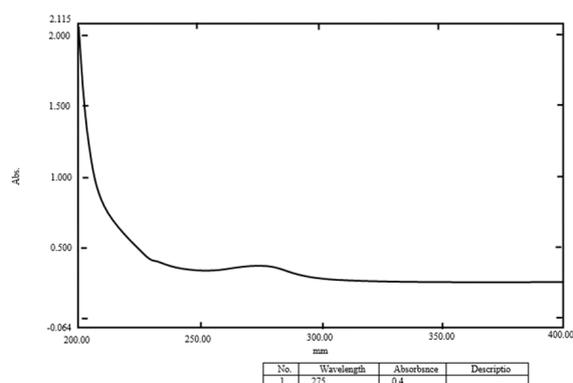
1. Ekstrak *A. tubulata* dan *Phyllospongia* sp. mempunyai aktivitas terhadap bakteri *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *E. coli* dan *S. saprophyticus*.
2. Ekstrak *A. tubulata* memiliki daya hambat dengan spektrum yang lebih luas dibandingkan ekstrak *Phyllospongia* sp. sedangkan ekstrak *Phyllospongia* sp. memiliki spesifitas terhadap bakteri *P. mirabilis*.
3. Dari hasil penelitian melalui teknik bioautografi, serapan terjadi pada panjang gelombang 275 *A. tubulata* dan 285 nm untuk *Phyllospongia* sp.

REFERENSI

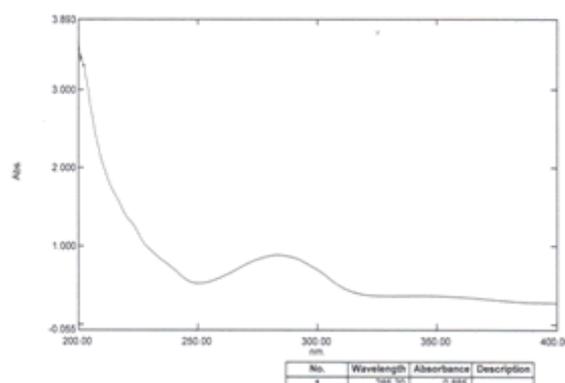
- BARA, R., ALY, A. H., PRETSCH, A., WRAY, V., WANG, B., PROKSCH, P., DEBBAB, A. (2013). "Antibiotically Active Metabolites from *Talaromyces wortmannii*, an endophyte of *Aloe vera*." *The Journal of Antibiotics* 10.1038/ja.2013.28.
- BARA, R. A., ZERFAß, I., LAI, D., LIN, W., DEBBAB, A., BRÖTZ-OESTERELT, H., PROKSCH, P. (2013). "New Natural Product from *Botryosphaeria australis*, an Endophyte from Mangrove *Avicennia marina*." *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology* 8(3): 139-145.
- BLUNT, J.W., COPP, B.R., KEYZERS, R.A., MUNRO, M.H.G. and PRINSEP, M.R. 2012. *Marine natural products*. *Nat. Prod. Rep.* 29:



Gambar 4. Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari ekstrak *Agelas tubulata* dan *Phyllospongia* sp. terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.



a. *Agelas tubulata*



b. *Phyllospongia* sp.

Gambar 5. Hasil uji spektrofotometer ultra violet

- 144–222, and previous reports in this series.
- BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R., 2004. Marine Natural products. *Nat Prod Rep.* 21,1-49.
- CHOMA, I. 2005. The use of thin layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis. *Journal of Chromatography A*.
- DAVIS, W.W. and STOUT, T. R. 1971. *Disc Plate Method of Microbiological Assay*.
- DENNING, D. 2006. *Branches on the tree of Life: Sponges*. Retrieved Februari 23, 2016, from <http://ebiomedica.com/prod/BOsponges.html>.
- MANASA, G. 2014. Structural Elucidation of Terpenoids by Spectroscopic Techniques. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. ISSN: 0974-2115.
- ORTEZ, J. 2005. *Disk Diffusion Testing in Manual of Antimicrobial Susceptibility testing*. Marie B. Coyle (Coord. Ed). American society for Microbiology.
- PINHEIRO, P and GONCALO J. 2012. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds-A Review of Spectroscopic Applications. Technical University of Lisbon. Portugal.
- POOLE, K. 2007. Efflux Pumps as Antimicrobial Resistance Mechanisms. *Annals of Medicine*, 39(3):162-176.
- POSANGI, J., Bara, R. 2014. Analisis Aktivitas dari Jamur Endofit yang terdapat dalam Tumbuhan Bakau *Avicennia marina* di Tasik Ria Minahasa. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis* , 1(1)30-38.
- ROMPAS, R. 2011. *Farmakognosi Laut (Sumber Baru ekonomi Kelautan)*. Jakarta: Dewan Kelautan Indonesia.
- SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X., & KIEMBLE, D.J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 7 ed. USA: John Wiley and Sons.
- TALEB-CONTINI, S. H., SALVADOR, M. J., WATANABE, E., ITO, I. Y. OLIVEIRA, D. C. R. D. (2003). "Antimicrobial Activity of Flavonoids and Steroids Isolated from Two *Chromolaena* Species". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 39(4).
- TYUKAVKINA, N.A., POGODAEVA N.N. and LUTSKI V. I (1970). Ultraviolet absorption of Flavonoids. *Irkutsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Division. Khimiya Prirodykh Soedineni*, Vol. 6, No.1. pp 24-27.
- WALKER D., ROBERT, JR. and HAWKINS J. E. 1952. *The Ultraviolet Absorption Spectra of Some Terpene Hydrocarbons*. *Journal of the American Chemical Society (ACS) Publications*.

Diterima: 25 Februari 2016

Disetujui: 18 April 2016