

## KARAKTERISASI EKSTRAK SPON LAUT *Axinella carteri* Dendy SECARA FISIKA, KIMIA DAN FISIKOKIMIA

Harrizul Rivai<sup>1</sup>, Meliyana<sup>2</sup>, dan Dian Handayani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang

<sup>2</sup>Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang

### Abstract

Characterization of the liquid extract of marine sponge (*Axinella carteri* Dendy) has been carried out by using the physical, chemical and physicochemical methods. The physical character of the extract was yellowish brown liquid, smells fishy and bitter taste, with a specific gravity of  $0.9644 \pm 0.02576$ . The marine sponge contained alkaloids, steroids and terpenoids, with total alkaloid content of  $0.9433\% \pm 0.136133\%$ . In physicochemical analysis, residue on drying was  $7.156\% \pm 0.2944\%$ , ash content  $2.5576\% \pm 0.2668\%$ , acid insoluble ash  $0.014\% \pm 0.0035\%$ , concentration of substances dissolved in water  $5.6153\% \pm 0.2759\%$ , concentration of substances dissolved in ethanol was  $6.4263\% \pm 0.4622\%$ , levels of a substance extracted from each fraction was  $0.9066\% \pm 0.0666\%$  in hexane fraction,  $0.1866\% \pm 0.03045\%$  in chloroform fraction,  $0.0616\% \pm 0.04297\%$  in ethyl acetate fraction and  $6.449\% \pm 0.07642\%$  in water fraction. Profile of thin layer chromatography (TLC) showed the existence five stain with value Rf 0.1; 0.16; 0.3; 0.44 and 0.56.

**Keywords :** *Axinella carteri* Dendy, Characterization, TLC

---

### Pendahuluan

Sebagai Negara Kepulauan yang besar di dunia dengan wilayah laut sangat luas, Indonesia memiliki sumber daya alam hayati laut yang besar. Seperti halnya daratan, laut dihuni oleh biota, yakni tumbuh-tumbuhan, hewan dan mikroorganisme hidup. Biota laut menghuni hampir semua bagian laut, mulai dari pantai, permukaan laut sampai dasar laut terjal. Keberadaan biota laut ini sangat menarik perhatian manusia (Romimohtarto dan Juwana, 2009).

Biota laut menghasilkan produk alam yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Di antara biota laut, Spon merupakan salah satu komponen biota penyusun terumbu karang yang mempunyai potensi bioaktif, akan tetapi belum banyak dimanfaatkan. Hewan laut ini mengandung senyawa aktif yang persentasenya lebih besar dibandingkan dengan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan darat (Muniarsih dan Rachmaniar, 1999).

Salah satu organisme laut yang menarik adalah spon laut *Axinella carteri* Dendy. Berdasarkan hasil studi literatur spon laut ini dilaporkan adanya beberapa senyawa alkaloid turunan guanidin, seperti 3-bromo himenialdisin, debromohimenialdisin, dan beberapa senyawa peptida yaitu axinellin A dan axinellin B. Aktivitas yang telah dilaporkan adalah sebagai

antitumor dan antineoplastik (Supriyono *et al.*, 1995; Marinlit, 2003).

Ekstrak untuk obat yang dibuat dari simplisia hewani dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan sebagai komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diolah menjadi produk jadi. Ekstrak sebagai bahan antara masih bisa menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal ataupun tetap sebagai campuran dengan ekstrak lain. Jadi untuk memperoleh produk yang terstandar maka bahan dan prosesnya haruslah terstandar pula (Departemen Kesehatan, 2000).

Agar spon laut ini dapat dimanfaatkan sebagai obat, maka ekstraknya harus distandardisasi terlebih dahulu. Salah satu cara standardisasi ekstrak adalah dengan menentukan karakter ekstrak. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengkarakterisasi ekstrak spon laut tersebut, baik secara fisika, kimia maupun fisikokimia.

## Metode Penelitian

### Alat

Seperangkat alat rotary evaporator (IKA<sup>®</sup>), piknometer, corong pisah, chamber, plat KLT (Silika gel F254 aluminium), pipa kapiler, lampu UV  $\lambda$  254 nm dan 365 nm (Model UVGL-25), oven (Memmert<sup>®</sup>)

### Bahan

Spon laut *A. carteri* Dendy, etanol 96%, n-heksan (Brataco), kloroform (Brataco), etil asetat (Brataco), natrium hidroksida (Brataco), aquadest, kapas, asam sulfat p.a (Merck), asam asetat anhidrat (Merck), serbuk magnesium, asam klorida p.a (Merck), amoniak p.a (Merck), ferri klorida (Merck), alfa-naftol (Merck), asam nitrat (Merck), kupri sulfat (Merck), merkuri sulfat (Merck), natrium nitrit (Merck), ninhydrin (Merck), bismut nitrat (Merck) dan kalium iodida.

## Pelaksanaan Penelitian

### Pengambilan Sampel

Sampel yang telah diteliti diambil di perairan Kepulauan Mandeh, Kecamatan Koto Sabaleh Tarusan, Kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat, pada kedalaman 4-6 meter di bawah permukaan laut.

### Pembuatan Reagen

- Pembuatan Pereaksi Molisch  
Timbang alfa-naftol 3 g dilarutkan dengan etanol 96% sampai 100 mL.
- Pembuatan Pereaksi Fehling  
Fehling A : Ditimbang sebanyak 6,9 g terusi ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) dilarutkan dengan air suling sampai 100 mL, tambahkan 2 tetes asam sulfat pekat.  
Fehling B : Ditimbang 36,4 g kalium natrium-tartrat (garam seinet) dan 10 g NaOH, dilarutkan dengan air suling sampai 100 mL.
- Pembuatan Pereaksi Millon's  
Larutan A : Ditimbang sebanyak 1 g  $\text{HgSO}_4$  kemudian dilarutkan dengan air sampai 90 mL, lalu ditambah 11 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat.  
Larutan B : Ditimbang pula 1 g kristal  $\text{NaNO}_2$  dilarutkan dengan air sampai 100 mL.
- Pembuatan Pereaksi Ninhydrin  
Ditimbang 0,1 g ninhydrin kemudian dilarutkan dengan air sampai 100 mL.
- Pembuatan Pereaksi Biuret  
Larutan A : NaOH 10 N (ditimbang 40 g NaOH dilarutkan dengan air sampai 100 mL).

Larutan B : Ditimbang sebanyak 5 g terusi dilarutkan dengan air sampai 100 mL, ditambahkan 2 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat.

- Pembuatan Pereaksi  $\text{FeCl}_3$   
Ditimbang sebanyak 1 g kristal  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dilarutkan dengan air sampai 100 mL.
- Pembuatan Pereaksi Salkowski  
Larutan A : Kloroform pekat  
Larutan B : Asam sulfat pekat.
- Pembuatan Pereaksi Liebermann-Buchard  
Larutan A : Asam sulfat pekat  
Larutan B : Asam asetat anhidrat.
- Pembuatan Pereaksi Dragendorff  
Larutan A : Ditimbang 4 g  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  kemudian dilarutkan dengan asam nitrat sampai 10 mL. Larutan B : Ditimbang 13,6 g KI kemudian dilarutkan dengan air sampai 25 mL. Campurkan larutan A dan B diamkan sampai memisah, diambil cairan jernih (orange) dilarutkan dengan air sampai 50 mL.
- Pembuatan Pereaksi Mayer  
Ditimbang sebanyak 1,35 g  $\text{HgCl}_2$  dan 50 g KI dilarutkan dengan air sampai 1000 mL.
- Pembuatan Larutan Pereaksi Air Kloroform  
Diambil 1,25 mL kloroform kemudian dikocok kuat dengan air sebanyak 500 mL.
- Pembuatan pereaksi Wagner (Bouchardat)  
Caranya: larutkan 1 g  $\text{I}_2$  dan 2 g KI dalam air sampai 50 mL

### Identifikasi Sampel

Sampel spon laut *A. carteri* Dendy telah diidentifikasi di Museum Zoologi Amsterdam Belanda dengan nomor koleksi ZMA POR. 10924.

### Ekstraksi Sampel

Sampel segar *A. carteri* dirajang dicuci dengan air suling, ditimbang sebanyak 100 g masukan ke dalam botol gelap kemudian dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 750 mL, ditutup, biarkan selama lima hari, sesekali diaduk. Setelah lima hari dituang dalam gelas piala, ampas diperas dan dicuci dengan etanol secukupnya hingga diperoleh 1000 mL maserat, dituang ke dalam bejana tertutup, biarkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya, selama 2 hari, diamkan dan disaring. Kemudian diuapkan maserat dengan menggunakan alat *rotary evaporator* pada tekanan rendah pada suhu tidak lebih dari  $50^\circ\text{C}$  sampai didapat ekstrak kental, kemudian ekstrak diencerkan dengan etanol 96% sampai 100 mL. Dilakukan karakterisasi ekstrak cair yang diperoleh yaitu menggunakan parameter fisika,

kimia, fisikokimia, dan penentuan kadar alkaloid total (Departemen Kesehatan, 1979).

### Fraksinasi

Ekstrak cair sebanyak 100 mL difraksinasi dengan berbagai macam pelarut mulai dari non polar, semi non polar, semi polar dan polar (n-heksan, Kloroform, etil asetat dan air). Ekstrak cair dimasukkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan 100 mL n-heksan kocok kuat, didiamkan sehingga terdapat dua lapisan, lapisan n-heksan terdapat pada bagian atas dan lapisan air dibawah. Dilakukan tiga kali pengulangan, kumpulkan lapisan n-heksan, diuapkan pelarut n-heksan dengan *rotari evaporator* sampai didapat 100 mL fraksi n-heksan. Kemudian lapisan air tadi dikocok lagi dengan 100 mL kloroform dalam corong pisah, didiamkan sehingga terdapat dua lapisan, dimana lapisan kloroform berada di bawah dan lapisan air di atas. Dilakukan tiga kali pengulangan, dikumpulkan lapisan kloroform, lalu diuapkan pelarut kloroform dengan menggunakan *rotari evaporator* sampai didapatkan 100 mL fraksi kloroform. Fraksi air dari kloroform tadi dikocok lagi dengan 100 mL etil asetat dalam corong pisah, lakukan tiga kali pengulangan, lapisan ini didiamkan dan dipisahkan, dimana lapisan etil asetat berada di atas dan lapisan air berada dibawah. Kumpulkan lapisan etil asetat kemudian diuapkan dengan *rotari evaporator* sampai didapat 100 mL fraksi etil asetat. Fraksi air sisanya dijadikan 100 mL. Didapatkan empat fraksi yaitu 100 mL fraksi n-heksan, 100 mL fraksi kloroform, 100 mL fraksi etil asetat dan 100 mL fraksi air.

### Pengujian Parameter Standar Ekstrak Parameter Fisika

- Parameter Organoleptik (Stahl, 1985; Departemen Kesehatan, 2000)  
Menggunakan panca indera mendiskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa. Caranya:
  - Bentuk (penglihatan) ; sampel diletakkan di atas dasar yang berwarna putih, dilihat bentuk / rupa dan warna.
  - Bau (penciuman) ; ambil sedikit ekstrak masukan dalam lumpang, gerus, dan dicium baunya.
  - Rasa ; ambil sedikit sampel diletakkan pada lidah dan dikecap-kecap selama 10-50 detik kemudian cuplikan dikeluarkan dari mulut dan penguji berkumur-kumur dengan air.
- Bobot Jenis (Departemen Kesehatan, 2000)

Gunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air. Atur hingga suhu ekstrak cair lebih kurang 20°C, masukkan ke dalam piknometer. Atur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C, buang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang. Kemudian bobot jenis sediaan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Bobot jenis ekstrak} = \frac{W3 - W1}{W2 - W1}$$

Keterangan :

- W1 = Bobot piknometer kosong (gram)  
W2 = Bobot piknometer berisi air (gram)  
W3 = Bobot piknometer berisi ekstrak (gram)

### Parameter Fisikokimia (Departemen kesehatan, 2000)

#### 1. Sisa Pengeringan

Ekstrak cair dipipet sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah ditara terlebih dahulu. Ekstrak diratakan dalam botol timbang, dengan menggoyangkan botol, hingga merupakan lapisan setebal lebih kurang 5 mm sampai 10 mm atau dipekatkan dengan *water bath* sampai ekstrak tidak bisa dituang. Jika ekstrak yang diuji berupa ekstrak kental, ratakan dengan bantuan pengaduk. Kemudian dimasukkan ke dalam oven, buka tutupnya, keringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Sebelum setiap pengeringan, biarkan botol dalam keadaan tertutup mendingin dalam desikator hingga suhu kamar dan dinyatakan dalam % <sup>b</sup>/<sub>v</sub>. Cara perhitungan sisa pengeringan / kadar zat terekstraksi adalah sebagai berikut :

$$\text{Sisa Pengeringan} = \frac{W1 - W0}{W2} \times 100\%$$

Keterangan :

- W0 = berat cawan kosong (gram)  
W1 = berat cawan + sampel setelah dikeringkan dengan oven (gram)  
W2 = volume sampel (mL)

#### 2. Kadar Abu Total

Dimasukkan 3 mL ekstrak cair ke dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara terlebih dahulu, ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, didinginkan dalam desikator, ditimbang. Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, disaring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama. Dimasukkan filtrat ke dalam krus, diuapkan,

kemudian dipijarkan hingga bobot tetap, ditimbang. Dan dihitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara, dinyatakan dalam % <sup>b/v</sup>. Dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar abu total} = \frac{W1 - W2}{W3} \times 100 \%$$

Keterangan :

- W1 = Berat krus + abu (gram)
- W2 = Berat krus (gram)
- W3 = Volume sampel (mL)

### 3. Kadar Abu Tidak Larut Dalam Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu, dididihkan dengan 25 mL asam klorida encer selama 5 menit, bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. dihitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

$$\text{Kadar abu yang tidak larut asam} = \frac{W1 - W2}{W3} \times 100 \%$$

Keterangan:

- W1 = Berat krus + abu (gram)
- W2 = Berat krus (gram)
- W3 = Volume sampel (mL)

### 4. Kadar Senyawa Yang Larut Dalam Air

Dimaserasi 5 mL ekstrak cair selama 24 jam dengan 100 mL air kloroform LP menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, disaring, dipipet 30 mL filtrat diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, kemudian dipanaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Dan dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal, dinyatakan dalam % <sup>b/v</sup>. dapat dilihat pada rumus berikut :

$$\text{Kadar Senyawa Yang Larut Dalam Air} = \frac{W1 - W0}{W2} \times 100 \%$$

Keterangan :

- W0 = berat cawan kosong (gram)
- W1 = berat cawan + sampel setelah dikeringkan dengan oven (gram)
- W2 = volume sampel (mL)

### 5. Kadar Senyawa Yang Larut Dalam Etanol

Dimaserasi 5 mL ekstrak cair selama 24 jam dengan 100 mL etanol (95%), menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam

pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol, dipipet 30 mL filtrat, lalu diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Dan dihitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap ekstrak awal, dinyatakan dalam % <sup>b/v</sup>. dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar Senyawa Yang Larut Dalam Etanol} = \frac{W1 - W0}{W2} \times 100 \%$$

Keterangan :

- W0 = berat cawan kosong (gram)
- W1 = berat cawan + sampel setelah dikeringkan dengan oven (gram)
- W2 = volume sampel (mL)

### 6. Kadar Zat Terekstraksi dari Masing-masing Fraksi

Dari masing-masing fraksi tersebut dipipet 10 mL, lalu dimasukkan dalam cawan penguap dan dikeringkan diatas *waterbath* sampai kering, sebelumnya cawan penguap sudah ditara dan didapatkan berat cawan kosong, setelah kering dimasukkan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam , didinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang. Lakukan pengeringan dan penimbangan ulang sampai didapat berat konstan, dinyatakan dalam % <sup>b/v</sup>. Kadar dari masing-masing fraksi dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar fraksi} = \frac{W1 - W0}{W2} \times 100 \%$$

Keterangan:

- W0 = berat cawan kosong (gram)
- W1 = berat cawan + sampel setelah dikeringkan dengan oven (gram)
- W2 = volume sampel (mL)

## Parameter Kimia

Penentuan parameter kimia dilakukan pada fraksi-fraksi ekstrak, mulai dari non polar sampai yang polar, seperti fraksi n-heksan, kloroform, etil asetat dan air (Departemen Kesehatan, 1995; Evans, 2002; Taur *et al.*, 2010; Pradhan *et al.*, 2010; Elijah *et al.*, 2010). Parameter yang akan ditentukan yaitu :

#### 1. Karbohidrat

##### a. Uji Molisch

Caranya : masukkan 0,1 mL larutan percobaan dalam tabung reaksi, uapkan di atas penangas air. Pada sisa tambahkan 2 mL air dan 5 tetes

Molisch LP. Tambahkan hati-hati 2 mL asam sulfat pekat, terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan, menunjukkan adanya karbohidrat.

b. Uji Fehling

Caranya : pada 1 mL ekstrak, tambahkan sama banyak larutan Fehling A dan larutan Fehling B, kemudian panaskan. Terbentuknya endapan merah bata menunjukkan adanya gula mereduksi. Dalam hal-hal tertentu reduksi terjadi dekat titik didih dan ditunjukkan oleh endapan merah bata.

2. Glikosida

a. Uji Keller-Kiliani

Didihkan 1 mL zat uji dengan 10 mL etanol 70% selama 2-3 menit, saring, ambil 5 mL filtrat tambahkan 10 mL air dan 5 mL larutan timbal asetat pekat, kocok dan saring. Kocok filtrat dengan 5 mL kloroform, biarkan memisah, pipet kloroform pada lapisan bawah dan diuapkan pelarut dengan penguapan hati-hati dalam piring porselen. Larutkan residu yang telah dingin dalam 3 mL asam asetat glasial yang mengandung 2 tetes larutan ferri klorida 5%. Pindahkan dengan hati-hati larutan ini ke permukaan 2 mL asam sulfat pekat, lapisan berwarna coklat kemerahan terbentuk pada perbatasan kedua cairan itu dan lapisan atas perlahan-lahan menjadi hijau kebiruan, yang menjadi gelap bila didiamkan.

b. Uji Borntrager

Tambahkan beberapa mL  $H_2SO_4$  encer pada 1 mL larutan ekstrak. Didihkan, saring dan sari filtrat tambahkan kloroform. Lapisan kloroform ditambahkan dengan 1 mL larutan amoniak. Terbentuknya warna merah pada lapisan kloroform menunjukkan adanya glikosida.

3. Protein dan Asam Amino

a. Uji Biuret

Tambahkan 1 mL larutan NaOH 40 % dan 2 tetes larutan  $CuSO_4$  1 % akan menghasilkan warna biru, dan tambahkan 1 mL ekstrak. Terbentuknya warna merah muda atau ungu violet menunjukkan adanya protein.

b. Uji Ninhydrin

Kedalam 1 mL larutan zat yang netral ditambahkan 2 tetes larutan ninhidrin 1 % dalam air kemudian dipanaskan sampai mendidih. Terbentuk warna biru menunjukkan adanya asam amino.

c. Uji Millon's

1 mL larutan uji asamkan dengan  $H_2SO_4$  dan tambahkan pereaksi Millon's dan panaskan

larutan ini. Warna kuning menunjukkan adanya protein.

4. Saponin

Sebanyak 1 mL ekstrak dididihkan dengan 5 mL aquades selama 5 menit. Campuran ini disaring selagi panas dan filtratnya digunakan untuk uji berikut :

a) Uji Emulsi : sebanyak 1 mL filtrat ditambah dengan 2 tetes minyak zaitun. Campuran ini ditambahkan lagi 2 tetes minyak zaitun dalam tabung reaksi lain. Campuran ini dikocok dan diamati terbentuknya emulsi, yang menunjukkan adanya saponin.

b) Uji Busa : sebanyak 1 mL filtrat diencerkan dengan 4 mL aquades. Campuran itu dikocok kuat-kuat dan kemudian diamati terbentuknya busa yang stabil selama 10 menit, yang menunjukkan adanya saponin.

5. Senyawa Fenolat dan Tanin

a. Uji Fenolat

- Senyawa fenolat spesifik dengan penambahan  $FeCl_3$  terbentuk warna biru

- Pada ekstrak uji, tambahkan larutan kalium dikromat pekat, terbentuknya endapan berwarna kuning menunjukkan adanya tanin dan senyawa fenolat

b. Uji Tanin

- larutan zat uji dalam air ditambah dengan larutan timbal asetat, terbentuk endapan putih menunjukkan adanya tannin

- pada 1 mL ekstrak, ditambah dengan larutan ferri klorida, gallitanin dan ellegitanin menghasilkan endapan berwarna biru-hitam, dan condensed tanin menghasilkan endapan berwarna hijau-kecoklatan

- sedikit ekstrak ditambah dengan larutan kalium ferri sianida dan amoniak. Warna merah tua menunjukkan adanya tanin.

6. Steroid dan Terpenoid

Sebanyak 9 mL etanol ditambahkan pada 1 mL ekstrak dan direfluks selama beberapa menit dan disaring. Filtratnya dipekatkan sampai 2,5 mL dalam tangas air mendidih. Sebanyak 5 mL air suling ditambahkan pada larutan pekat itu, diamkan selama 1 jam dan kemudian disaring. Filtratnya disari dengan 2,5 mL kloroform dengan menggunakan corong pisah. Sari kloroform itu digunakan untuk uji berikut :

a. Uji Liebermann Buchard : Sebanyak 0,5 mL sari kloroform teteskan dalam plat tetes,

biarkan kering, setelah kering ditambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat apabila terbentuk warna merah ini menyatakan positif untuk terpenoid dan warna hijau positif untuk steroid.

- b. Uji Salkowski untuk steroid : Sebanyak 0,5 mL sari kloroform dalam tabung reaksi ditambahkan hati-hati dengan 1 mL asam sulfat pekat sehingga membentuk lapisan bawah. Timbulnya warna merah kebiruan sampai warna merah cherry dalam lapisan kloroform dan fluoresensi hijau pada lapisan asam menunjukkan adanya senyawa steroid.
  - c. Uji Terpenoid : Sebanyak 0,5 mL sari kloroform diuapkan sampai kering pada tangas air dan dipanaskan dengan 3 mL asam sulfat pekat selama 10 menit pada tangas air. Timbulnya warna abu-abu menunjukkan adanya terpenoid.
7. Alkaloid
- Sebanyak 1 mL ekstrak dididihkan dengan 5 mL HCL 2 % pada tangas uap. Campuran itu disaring dan 1 mL filtrat dimasukkan masing-masing dalam 4 buah tabung reaksi. Masing-masing filtrat ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi berikut:
- a. Pereaksi Dragendorff : endapan merah-jingga menunjukkan adanya alkaloid
  - b. Pereaksi Mayer: Endapan berwarna putih krim menunjukkan adanya alkaloid
  - c. Pereaksi Wagner (Bouchardat): Endapan berwarna coklat-kemerahan menunjukkan adanya alkaloid
8. Resin
- a. Uji Pengendapan : 1 mL ekstrak campur dengan 15 mL etanol 96 %. Ekstrak alkohol tersebut tuang kedalam 20 mL air suling dalam gelas piala. Terbentuknya endapan menandakan adanya resin.
  - b. Uji Warna : 1 mL ekstrak campurkan dengan kloroform, dikeringkan. Sari kloroform ditambahkan 3 mL acetone dan tambahkan 3 mL HCl. Dimana campuran tersebut dipanaskan dengan water bath selama 30 menit. Warna merah muda akan berubah menjadi warna merah tua, menandakan adanya resins.
9. Flavonoid
- Sebanyak 1 mL ekstrak dipanaskan dengan 10 mL etil asetat dalam air mendidih selama 3

menit. Campuran itu disaring dan filtratnya digunakan untuk uji berikut:

- a) Uji Amonium : sebanyak 4 mL filtrat dikocok dengan 1 mL larutan amoniak encer (1%). Lapisan-lapisan dibiarkan memisah. Warna kuning terlihat pada lapisan amoniak, yang menunjukkan adanya flavonoid.
- b) Uji Aluminium Klorida : sebanyak 4 mL filtrat dikocok dengan 1 mL larutan aluminium klorida 1 % dan diamati timbulnya perwarnaan. Endapan kuning menunjukkan adanya flavonoid.
- c) Uji Shinoda : ekstrak ditambah dengan logam magnesium dan HCL pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya flavonoid.

#### 10. Uji Minyak dan Lemak

Sebanyak 0,5 mL ekstrak, ditekan diantara kertas saring, dan kertas saring tersebut diamati, terlihatnya kertas saring yang tembus pandang menandakan adanya minyak. Sebagai pembanding gunakan minyak zaitun.

#### Profil Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak cair difraksinasi terlebih dahulu dengan pelarut n-heksan, kloroform, etil asetat dan air kemudian masing-masing fraksi diuji profil KLT dengan menghitung harga RF dari masing-masing komponen (Departemen Kesehatan, 1979; Stahl, 1985) :

$$RF = \frac{\text{Jarak yang ditempuh komponen}(hk)}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}(he)}$$

#### Penetapan Kadar Alkaloid Total

Berdasarkan informasi Data Base Marine Literatur (Marinlit, 2003) dilaporkan spon laut *A. Carteri* Dendy mengandung senyawa golongan alkaloid begitu pula uji kimia yaitu menggunakan pereaksi Dragendorff, pereaksi Mayer dan pereaksi Wagner menunjukan hasil yang positif, sehingga kadar alkaloid total dapat ditentukan.

Metoda penetapan golongan alkaloid total ditentukan secara gravimetri dimana dipipet 10 mL ekstrak cair, sari dengan menggunakan 100 mL metanol dan 10 mL amoniak, dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit kemudian disaring. Proses ekstraksi diulangi sampai tidak memberikan reaksi positif terhadap alkaloid. Ekstrak ditambah dengan 50 mL asam klorida 1 N, sari diuapkan hingga volume kurang lebih 25 mL kemudian

disaring ke dalam corong pisah. Filtrat dibasakan dengan natrium hidroksida sampai pH 10. kemudian disari beberapa kali dengan kloroform sampai alkaloid tersari sempurna. Sari kloroform diuapkan pada suhu 50°C, kemudian dikeringkan pada suhu 100°C hingga bobot tetap. Timbang sebagai kadar alkaloid total, dinyatakan dalam % <sup>b/v</sup> (Badan POM RI, 2006). Dengan rumus berikut :

$$\text{Kadar alkaloid total} = \frac{W2 - W0}{W1} \times 100\%$$

Keterangan :

W0 = berat cawan kosong setelah ditara (gram)

W1 = volume sampel (mL)

W2 = berat cawan + berat alkaloid total setelah dikeringkan (gram)

### Hasil Dan Pembahasan

Setelah dilakukan penelitian mengenai karakteristik ekstrak cair spon laut *A. carteri* Dendy secara fisika, kimia dan fisikokimia adalah sebagai berikut :

1. Dari 100 g spon laut *A. carteri* Dendy setelah diekstraksi didapatkan ekstrak etanol sebanyak 100 mL sehingga 1 mL ekstrak cair setara dengan 1 g spon laut segar.

2. Pemeriksaan organoleptik dilakukan secara visual terhadap ekstrak spon laut *A. carteri* Dendy meliputi bentuk, warna, bau dan rasa. Dari pengamatan didapatkan hasil. Dapat dilihat pada Tabel I Penentuan organoleptik ini termasuk salah satu parameter spesifik yang ditentukan dengan menggunakan panca indera dan bertujuan untuk pengenalan tahap awal secara sederhana.

3. Parameter fisika yang dilakukan selain dari organoleptik yaitu bobot jenis yang menggunakan alat piknometer, dimana prinsipnya adalah massa persatuan volume pada suhu kamar tertentu untuk memberikan batasan antara ekstrak cair dan ekstrak kental, bobot jenis juga terkait dengan kemurnian dan kontaminasi dari ekstrak.

Tabel 1. Hasil Parameter Fisika

No.	Parameter	Hasil
1.	Organoleptik	Bentuk : Cair Warna : Coklat Kekuningan Bau : Amis Rasa : Pahit
2.	Bobot Jenis	0,9644 ± 0,02576

4. Sisa pengeringan diperoleh 7,0993 % ± 0,20059 %. Sisa pengeringan ditetapkan untuk menjaga kualitas ekstrak. Disamping untuk penentuan rendemen ekstrak, dapat juga untuk menentukan jumlah zat lain yang mudah menguap pada ekstrak.

5. Penentuan kadar abu berguna untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Prosesnya ekstrak dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik saja. Kadar abu total ekstrak didapat sebesar 2,5576 % ± 0,2668 % dan kadar abu yang tidak larut dalam asam sebesar 0,014 % ± 0,0035 %. Hal ini menunjukkan bahwa sisa anorganik dan unsur mineral yang terdapat dalam ekstrak sama dengan kadar abu total dan kadar anorganik dan unsur mineral yang tidak larut dalam asam sama dengan kadar abu yang tidak larut dalam asam.

Tabel II. Hasil Parameter Fisikokimia

No.	Parameter	Hasil
1.	Sisa Pengeringan	7,0993 % ± 0,20059
2.	Kadar Abu Total	2,5576 % ± 0,2668
3.	Kadar abu tidak larut asam	0,014 % ± 0,0035
4.	Kadar Senyawa Yang Larut Dalam Air	5,6153 % ± 0,2759
5.	Kadar Senyawa Yang Larut Dalam Etanol	6,4263 % ± 0,4622
6.	Kadar Zat Terekstraksi dari Masing-masing Fraksi:	
	1. Fraksi n-Heksan	0,9066 % ± 0,0666
	2. Fraksi Kloroform	0,1866 % ± 0,03045
	3. Fraksi Etil asetat	0,016 % ± 0,035408
	4. Fraksi Air	6,449 % ± 0,07642

6. Kadar senyawa yang terlarut dalam air dari ekstrak cair diperoleh 5,6153 % ± 0,2759 % dan dalam etanol sebesar 6,4263 % ± 0,4622 %. Ini berarti ekstrak lebih banyak terlarut dalam etanol dibandingkan dalam air. Parameter ini bertujuan memberikan jaminan bahwa selama proses tidak meninggalkan sisa pelarut yang memang seharusnya tidak boleh ada, Sedangkan untuk ekstrak cair menunjukkan jumlah pelarut (Etanol) sesuai dengan yang ditetapkan.

7. Penentuan kandungan zat terekstraksi dari masing-masing fraksi dimana kadar yang diperoleh untuk fraksi n-heksan 0,9066 % ± 0,0666 %, fraksi kloroform 0,1866 % ± 0,03045 %, fraksi etil asetat 0,016 % ± 0,035408 %, fraksi air 6,449 % ± 0,07642 %. Ini menunjukkan bahwa kadar zat terekstraksi paling tinggi terdapat pada fraksi air dan paling rendah pada fraksi etil asetat.

Tabel III. Hasil Pengujian Metabolit Primer dan Sekunder dari Ekstrak Cair Spon Laut *A. carteri* Dendy

Parameter kimia	Pengujian	Pengamatan	Kesimpulan
Karbohidrat	1. Uji Molisch	Tidak terbentuk cincin berwarna ungu pada batas cairan	Negatif
	2. Uji Fehling	Tidak terbentuk endapan merah bata	Negatif
Glikosida	1. Uji Keller-Kiliani	Tidak terbentuk lapisan coklat kemerahan pada perbatasan kedua cairan	Negatif
	2. Uji Borntrager	Tidak terjandinya perubahan warna menjadi merah	Negatif
Protein dan Asam amino	1. Uji Biuret	Tidak terjandinya perubahan warna menjadi ungu	Negatif
	2. Uji Ninhydrin	Tidak terjandinya perubahan warna menjadi biru	Negatif
	3. Uji Millon's	Tidak terjandinya perubahan warna menjadi kuning	Negatif
Saponin	1. Uji Emulsi	Tidak terbentuk emulsi	Negatif
	2. Uji Busa	Tidak adanya busa yang stabil selama 10 menit	Negatif
Senyawa Fenolat dan Tanin	1. Fenolat		
	a. Ferri klorida	Tidak ada perubahan warna menjadi biru	Negatif
	b. Kalium bikromat	Terjadinya perubahan warna menjadi kuning	Negatif
	2. Tanin		
	a. Timbal asetat	Terbentuk endapan putih	Negatif
	b. Ferri klorida	Tidak terjandinya perubahan warna	Negatif
c. Kalium ferri sianida	Tidak terjandinya perubahan warna	Negatif	
Steroid dan Terpenoid	1. Uji Liebermann-Buchard	Terjadi perubahan warna menjadi hijau kemerahan	Positif
	2. Uji Salkowiski	Terjadi perubahan warna menjadi kehijauan	Positif
	3. Uji Terpenoid	Terjadi perubahan warna menjadi hijau keabu-abuan	Positif
Alkaloid	1. Uji Dragendorff	Terbentuk endapan merah jingga	Positif
	2. Uji Mayer	Terbentuk endapan putih	Positif
	3. Uji Wagner	Terbentuk endapan coklat kemerahan	Positif
Resin	1. Uji Pengendapan	Tidak terbentuk endapan	Negatif
	2. Uji Warna	Tidak terjandinya perubahan warna	Negatif
Flavonoid	1. Uji Shinoda	Tidak terjandinya perubahan warna menjadi merah	Negatif
	2. Uji Amonium	Tidak terjandinya perubahan warna menjadi kuning	Negatif
	3. Uji Almunium klorida	Tidak terbentuk endapan kuning	Negatif
Minyak dan Lemak	Kertas Saring	Pada kertas saring tidak terlihat tembus pandang	Negatif

8. Pada pengujian parameter kimia meliputi pengujian metabolit primer dan metabolit sekunder dari ekstrak cair dan masing-masing fraksi. Fraksi yang ditentukan yaitu fraksi n-heksan, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan fraksi air. Setelah dilakukan pengujian didapatkan untuk senyawa fenolat dan tanin ekstrak cair dan fraksi air memberikan reaksi timbulnya endapan kuning dengan peraksi kalium bikromat, begitu pula dengan penambahan larutan timbal asetat memberikan reaksi endapan putih, tetapi untuk reaksi spesifik senyawa fenolat dan tanin yaitu menggunakan larutan ferri klorida tidak menimbulkan perubahan warna. Jadi dapat disimpulkan ekstrak cair dan fraksi air tidak mengandung senyawa fenolat dan tanin.

Ekstrak cair menunjukkan perubahan warna pada pengujian steroid dan terpenoid dengan mengambil sari kloroform yang ditetesi pereaksi Liebermann buchard, uji salkowiski dan uji terpenoid, dimana steroid berada pada fraksi n-heksan dan terpenoid berada pada fraksi n-heksan dan fraksi air. Hasil dapat dilihat pada Tabel IV dan V, Gambar 2 dan 3

Menurut Marinlit (2003) spon laut *A. carteri* Dendy mengandung alkaloid. Ini terbukti pada pengujian menggunakan pereaksi Dragendorff, Mayer dan Wagner (Bouchardat) yang memberikan perubahan warna pada ekstrak cair, fraksi n-heksan, fraksi kloroform dan fraksi air kecuali tidak terdapat pada fraksi etil asetat. Hasil uji dengan pereaksi

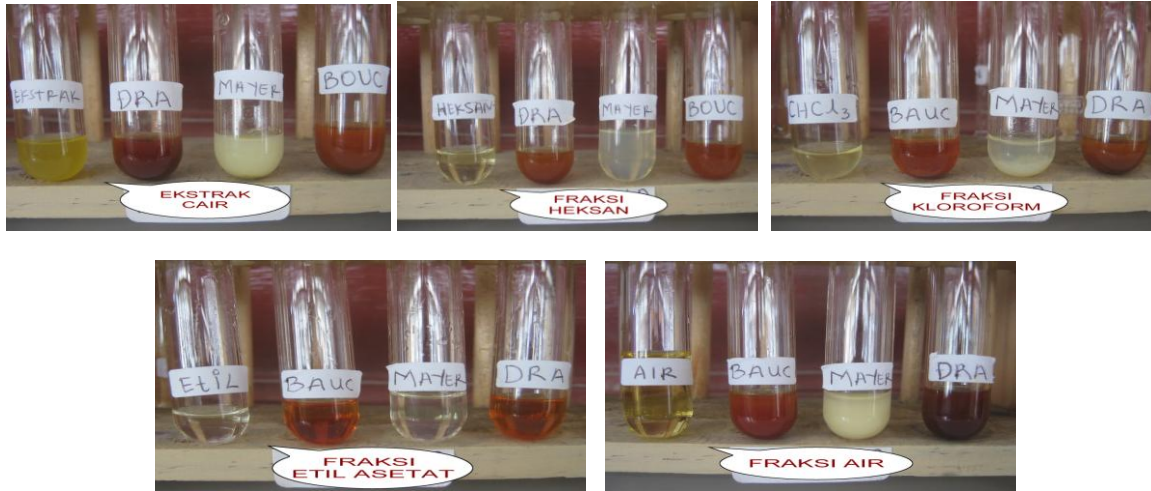


Dragendorff terbukti positif dengan timbulnya endapan merah jingga, uji Mayer timbul endapan putih, uji Wagner juga timbul endapan coklat

kemerahan. Ini membuktikan bahwa ekstrak cair mengandung alkaloid. Hasil dapat dilihat pada gambar1.

Tabel IV. Hasil pengujian metabolit primer dan sekunder dari ekstrak cair dan masing-masing fraksi spon laut *Axinella carteri* Dendy

Parameter kimia	Pengujian	Pengamatan				
		Ekstrak Cair	Fraksi - Fraksi Ekstrak			
			Heksan	CHCl <sub>3</sub>	Etil asetat	Air
Karbohidrat	1. Uji Molisch	-	-	-	-	-
	2. Uji Fehling	-	-	-	-	-
Glikosida	1. Uji Keller-Kiliani	-	-	-	-	-
	2. Uji Borntrager	-	-	-	-	-
Protein dan Asam amino	1. Uji Biuret	-	-	-	-	-
	2. Uji Ninhydrin	-	-	-	-	-
	3. Uji Millon's	-	-	-	-	-
Saponin	1. Uji Emulsi	-	-	-	-	-
	2. Uji Busa	-	-	-	-	-
Senyawa Fenolat dan Tanin	1. Fenolat					
	a. Ferri klorida	-	-	-	-	-
	b. Kalium bikromat	+	-	-	-	+
	2. Tanin					
	a. Timbal asetat	+	-	-	-	+
	b. Ferri klorida	-	-	-	-	-
c. Kalium ferri sianida	-	-	-	-	-	
Steroid dan Terpenoid	1. Uji Liebermann-Buchard	+	+	+	+	-
	2. Uji Salkowiski	-	-	-	-	-
	3. Uji Terpenoid	+	+	+	-	+
Alkaloid	1. Uji Dragendorff	+	+	+	-	+
	2. Uji Mayer	+	+	+	-	+
	3. Uji Wagner	+	+	+	-	+
Resin	1. Uji Pengendapan	-	-	-	-	-
	2. Uji Warna	-	-	-	-	-
Flavonoid	1. Uji Shinoda	-	-	-	-	-
	2. Uji Amonium	-	-	-	-	-
	3. Uji Almunium klorida	-	-	-	-	-
Minyak dan Lemak	Kertas Saring	-	-	-	-	-



Gambar 1. Hasil positif timbulnya endapan pada ekstrak cair, fraksi n-heksan, fraksi kloroform dan fraksi air setelah ditetesi pereaksi Dragendorff, Mayer dan Wagner (Bouchardat), kecuali pada fraksi etil asetat tidak ada timbulnya endapan.



Gambar 2. Ekstrak cair, fraksi n-heksan, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan fraksi air sebelum ditetesi pereaksi Liebermann-Buchard.

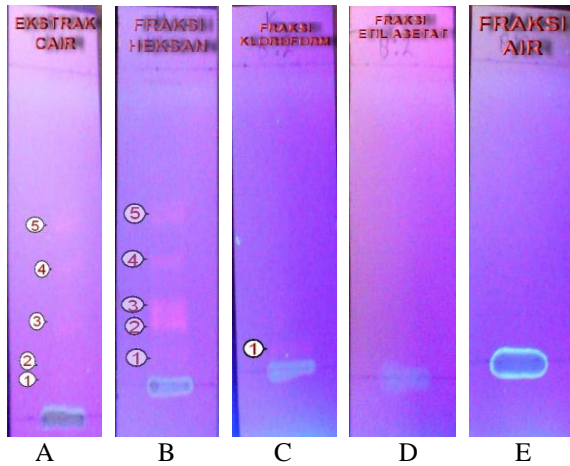


Gambar 3. Hasil positif setelah ditetesi pereaksi Liebermann-Buchard pada ekstrak cair, fraksi n-heksan dan fraksi air sedangkan fraksi kloroform dan fraksi etil asetat menunjukkan tidak adanya perubahan warna.

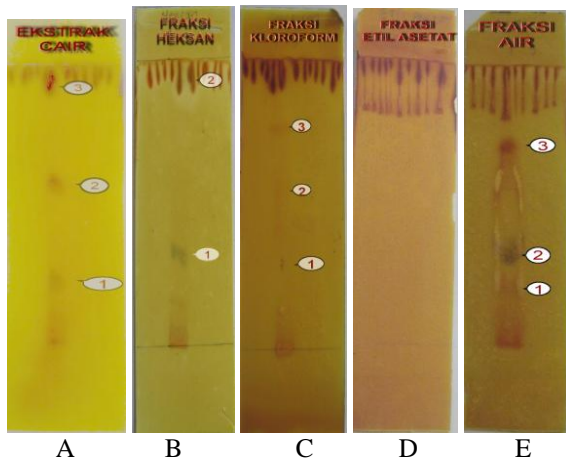
9. Pembuktian alkaloid juga dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis yang dielusi dengan pelarut kloroform : metanol : amoniak (7 : 3 : 0.1) dengan

penampak noda Dragendorff. Pada ekstrak cair menunjukkan tiga buah noda dengan RF 0,24; 0,56 dan 0,9 alkaloid tersebut berada pada fraksi n-heksan yang menunjukkan dua buah noda dengan nilai RF 0,32; 0,88 pada fraksi kloroform menunjukkan dua buah noda dengan RF 0,3; 0,56; 0,74 dan tiga noda pada fraksi air dengan nilai RF 0,24; 0,32 dan 0,7 (Hasil dapat dilihat pada Gambar 5).

Ekstrak cair dan masing-masing fraksi ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dengan pelarut n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8 : 2. Kromatogram dilihat dengan lampu ultraviolet  $\lambda$  254 nm dan 365 nm. Pada lampu UV dengan  $\lambda$  365 nm noda tidak terlihat tapi dengan lampu UV  $\lambda$  254 nm memperlihatkan noda berwarna ungu. Hasilnya, ekstrak cair terdapat lima buah noda dengan Nilai RF 0,1; 0,16; 0,3; 0,44 dan 0,56, fraksi n-heksan menunjukkan lima buah noda dengan Nilai RF 0,1; 0,2; 0,26; 0,4 dan 0,34, fraksi kloroform terlihat satu noda Nilai RF = 0,1 sedangkan fraksi etil asetat dan air tidak adanya noda yang timbul pada plat KLT (Hasil dapat dilihat pada Gambar 4). Penentuan RF ini bertujuan untuk melihat berapa senyawa-senyawa yang ada pada ekstrak dan untuk mengidentifikasi suatu senyawa didalam ekstrak selain itu juga dapat melihat perbandingan eluen yang cocok untuk pemisahan.



Gambar 4. Hasil Profil KLT Ekstrak Cair dan Masing-Masing Fraksi Dari Spon Laut *A. carteri* Dendy Dilihat Dengan Lampu Ultraviolet  $\lambda$  254 nm



Gambar 5. Hasil Profil KLT Ekstrak Cair dan Masing-Masing Fraksi Dari Spon Laut *A. carteri* Dilihat Dengan Penampak Noda Dragendorff.

10. Dari data di atas kadar golongan alkaloid total dapat ditentukan, dengan menggunakan metode penetapan kadar golongan alkaloid total secara gravimetri dimana ekstrak cair spon laut *A. carteri* Dendy disari dengan metanol dan amoniak, alkaloid dalam sampel akan membentuk alkaloid base yang tersari dalam metanol. Untuk membebaskan alkaloidnya ditambahkan HCl 1 N yang akan membentuk garam alkaloid yang tersari dalam air. Kemudian pelarut diuapkan, sehingga tinggal alkaloid bebas yang kemudian ditambahkan NaOH membentuk alkaloid base. Sifat alkaloid base mudah larut dalam pelarut organik, sehingga digunakan kloroform. Didalam corong pisah tampak dua lapisan yaitu lapisan kloroform berada pada lapisan bawah dan lapisan air dilapisan atas. Alkaloid tertarik

kelapisan kloroform selanjutnya pelarut kloroform diuapkan sehingga yang tinggal alkaloid total, yang kemudian ditimbang sampai bobot konstan. Kadar yang diperoleh yaitu  $0,9433 \% \pm 0,136133 \%$ , dinyatakan dalam  $\% \text{ b/v}$

### Kesimpulan

1. Secara Fisika, ekstrak spon laut berbentuk cair, berwarna coklat kekuningan, berbau amis dan berasa pahit, dengan bobot jenis  $0,9644 \pm 0,02576$ .
2. Secara kimia ekstrak spon laut menunjukkan adanya suatu alkaloid, steroid dan terpenoid, dengan kadar alkaloid total sebesar  $0,9433 \% \pm 0,136133 \%$ .
3. Secara fisikokimia, sisa pengeringan yaitu  $7,156 \% \pm 0,2944 \%$ , kadar abu total  $2,5576 \% \pm 0,2668 \%$ , kadar abu tidak larut dalam asam  $0,014 \% \pm 0,0035 \%$ , kadar senyawa yang larut dalam air  $5,6153 \% \pm 0,2759 \%$ , kadar senyawa yang larut dalam etanol  $6,4263 \% \pm 0,4622 \%$ , kadar zat terekstraksi dari masing-masing fraksi yaitu, fraksi n-heksan  $0,9066 \% \pm 0,0666 \%$ , fraksi kloroform  $0,1866 \% \pm 0,03045 \%$ , fraksi etil asetat  $0,0616 \% \pm 0,04297 \%$  dan fraksi air  $6,449 \% \pm 0,07642 \%$ . Profil kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak menunjukkan adanya suatu alkaloid yang berada pada fraksi n-heksan, fraksi kloroform dan fraksi air. Dilihat dengan lampu UV 254 nm dengan ekstrak cair dan fraksi n-heksan menunjukkan lima buah noda, fraksi kloroform terlihat satu noda, sedangkan pada fraksi etil asetat dan air tidak adanya noda yang terlihat pada plat KLT.

### Daftar Pustaka

- Badan POM RI, 2006, Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia, Vol.2, BPOM RI, Jakarta
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979, *Farmakope Indonesia*, Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia., 2000, *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Edisi 1, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta

- Elijah, P., Obidoa., Onyechi, Joshua, Nkechi J., 2010, Phytochemical Analysis of *Cocos nucifera* L, *Journal of Pharmacy Research*, 3(2): 280-286
- Evans, W.C., 2002, *Trease and Evans' Pharmacognosy*, 15<sup>th</sup> Edition, W.B. Saunders Company Ltd, London
- Marinlit., Version September 2003, *A. Marine Literature Database Produced and Maintained, The Departement of Chemistry, University of Canterbury, New Zealand*
- Muniarsih T, dan R. Rachmaniar., 1999, Isolasi Substansi Bioaktif Antimikroba dari Spons Asal Pulau Pari Kepulauan Seribu. *Prosiding Seminar Bioteknologi Kelautan Indonesia I '98. Jakarta 14 – 15 Oktober 1998: 151 - 158.* Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jakarta
- Pradhan, P., L. Joseph, M. George, N. Kaushik, R. Chulet., 2010, Pharmacognostic, Phytochemical & Quantitative Investigation of *Saraca asoca* Leaves, *Journal of Pharmacy Research*, 3(4): 776-780
- Romimohtarto, K. dan S. Juwana., 2009, *Biologi Laut: Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut*, Djambatan, Jakarta
- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara Kromatografi Dan Mikroskopi*, Diterjemahkan Oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, Penerbit ITB, Bandung
- Supriyono, A., B. Schwarz, V. Wray, L. Witte, W. E. G. Muller, R. Van Soest, W. Sumaryono and P. Proksch., 1995, Bioactive Alkaloid from the Tropical Marine sponge *Axinella carteri*, *Verlag der Zeitschrift Fur Naturforschung, Z. Naturforsch*, 50: 669-674
- Taur, D.J., S.B. Taware, R.N. Patil, R.Y. Patil and M.D. Kharya, 2010, Pharmacognostical and Preliminary Phytochemical Evaluation of *Clitoria ternatea* Leaves, *Phcog. J.*, 2 (9): 260-26