

Uji Aktivitas Mukolitik Ekstrak Metanol Tumbuhan Paku Perak (*Pityrogramma calomelanos*)

Mucolytic Activity Test of The Methanol Extract of The Silver Fern (*Pityrogramma calomelanos*)

Nur indah Kumala Sari*, Suyatno Sutoyo, Tukiran, dan Nurul Hidajati

Jurusan Kimia, Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang, Surabaya (60231), Indonesia

*The corresponding author: indahnur471@gmail.com

Abstrak. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas mukolitik ekstrak metanol tumbuhan paku perak (*P. calomelanos*). Dalam penelitian ini ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, uji kualitatif dilakukan dengan pereaksi ferri klorida dan Shinoda test. Uji aktivitas mukolitik dilakukan secara *in vitro* berdasarkan penurunan viskositas mukus usus sapi. Nilai viskositas yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan uji ANAVA satu arah, dilanjutkan uji LSD untuk mengetahui signifikan perbedaan antar kelompok perlakuan. Dari hasil penelitian diperoleh ekstrak berupa padatan berwarna coklat. Uji kualitatif ekstrak dengan pereaksi ferri klorida menghasilkan warna hijau kecoklatan yang menunjukkan keberadaan senyawa fenolik, sedangkan timbulnya warna kuning pada uji Shinoda test menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid. Hasil uji aktivitas mukolitik menunjukkan bahwa ekstrak memiliki aktivitas mukolitik. Isolat dengan konsentrasi 0,4% memiliki aktivitas mukolitik yang setara dengan asetilsistein 0,1%.

Kata-kata kunci: *Pityrogramma calomelanos*, ekstrak metanol, aktivitas mukolitik

Abstract. The aims of this research is to determine the mucolytic activity of methanol extract of silver fern (*P. calomelanos*). In this research extraction was carried out by maceration method. Qualitative test was done by ferric chloride reagent and Shinoda test. Mucolytic activity assay was performed *in vitro* based on the decreasing the viscosity of intestinal mucus cow. Viscosity values were analyzed statistically using one-way ANOVA test, followed by LSD test to determine significant differences between treatment groups. From the results of the study, it had been obtained extracts in the form of brown solid. The qualitative test of the extract with ferric chloride reagent produced a color which showed the existence of phenolic compound, while the yellow color in the Shinoda Test showed the existence of flavonoid compound. The result of mucolytic activity test

showed that the extract had mucolytic activity. Extract with a concentration of 0.4% had mucolytic activity equivalent to acetylcysteine 0.1%.

Keywords: *Pityrogramma calomelanos*, methanol extract, mucolytic activity

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang sedang berkembang, salah satunya ditandai dengan pesatnya perkembangan industri. Hal tersebut memiliki dampak positif terhadap kehidupan manusia berupa makin luasnya lapangan kerja, sehingga berpengaruh pada peningkatan sosial ekonomi masyarakat. Selain itu, terdapat dampak negatif berupa timbulnya masalah kesehatan yang ditimbulkan oleh pencemaran udara yang berasal dari asap pabrik saat proses industri atau dari hasil samping produksinya[1].

Salah satu penyakit yang sering di alami oleh masyarakat adalah penyakit saluran nafas. Penyakit tersebut berhubungan dengan sistem pernafasan manusia. Penyakit saluran nafas merupakan masalah yang cukup besar dan utama di Indonesia pada saat ini. Angka kesakitan dan kematian akibat penyakit saluran napas seperti ISPA (Infeksi saluran napas akut), bronkhitis,

asma, dan tuberkulosis masih menduduki tingkat tertinggi [2]. Penderita Penyakit respirasi seperti bronkhitis, asma, dan infeksi saluran pernapasan akut biasanya ditandai dengan batuk berdahak yang terus-menerus hingga beberapa minggu.

Batuk merupakan suatu mekanisme fisiologi protektif yang bermanfaat untuk mengeluarkan dan membersihkan saluran pernapasan dari dahak, zat-zat perangsang asing yang terhirup, partikel asing, dan unsur-unsur infeksi [3]. Pada kondisi tersebut terjadi peningkatan produksi mukus. Mukus yang diproduksi sifatnya kental sehingga berpengaruh pada pernafasan. Mukus kental dapat dikeluarkan melalui proses pengenceran. Secara fisiologis silia tidak mampu mengeluarkan mukus karena terlalu kental [4]. Mukus yang diproduksi pada saluran pernafasan berupa cairan kompleks selaput gel mukoprotein dan mukopolisakarida. Komposisi mukus adalah 95% air dan 5% glikoprotein. Sementara itu mukus intestinal mamalia terdiri dari air (97,5%), protein (0,8%), substansi organik lain (0,73%), dan garam organik (0,88%) [5].

Bahan aktif mukolitik dapat membantu mengurangi kekentalan dahak sehingga mudah dikeluarkan. Bahan tersebut mampu merombak dan melarutkan dahak sehingga viskositasnya berkurang dan mempermudah pengeluarannya. Bahan aktif mukolitik sintetik yang biasa digunakan adalah bromheksin, ambroksol, dan asetilsistein. Namun penggunaan bahan aktif tersebut memiliki efek samping yang kurang baik bagi kesehatan.

Penggunaan bahan alam sebagai obat tradisional mukolitik lebih aman dan memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi obat berbagai macam penyakit. Beberapa tanaman obat tradisional telah dikenal masyarakat untuk penyembuhan penyakit respirasi seperti bronkhitis dan radang tenggorokan kronis, antara lain *Echinacea* (*Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea*), *sambiloto* (*Andrographis paniculata*), dan *Rhododendron dauricum*. Tanaman *Echinaceae* mengandung senyawa aktif berupa minyak atsiri, alkamida, polialkena, polialkuna, dan turunan asam kafeat. *Sambiloto* memiliki kandungan senyawa aktif berupa flavonoid dan lakton. Sementara itu, *Rhododendron dauricum* L. mengandung beberapa senyawa bioaktif flavonoid *farrerol*, *scopoletin*, *umbeliferone*, *hiperosida*, *kaempferol* dan *kuersetin* [6].

Beberapa penelitian melaporkan bahwa aktivitas mukolitik ekstrak etanol daun sirih merah pada konsentrasi 0,3% setara dengan asetilsistein 0,1%. Selain itu ekstrak metanol daun sirih merah juga memiliki aktivitas mukolitik pada konsentrasi 0,3% setara dengan asetilsistein 0,1%. Fraksi metanol mengandung senyawa golongan saponin, flavonoid, dan polifenol. Ekstrak diklorometana tumbuhan paku *Chingia sakayensis* dengan konsentrasi 0,6% dilaporkan memiliki aktivitas mukolitik setara dengan asetilsistein 0,1% dan dalam ekstrak tersebut ditemukan senyawa steroid β -sitosterol dan flavonoid *farrerol*. Ekstrak etanol daun kembang sepatu pada konsentrasi 0,60% memiliki aktivitas mukolitik yang setara dengan asetilsistein 0,1% [7].

Tumbuhan paku perak (*P. calomelanos*) merupakan salah satu jenis tumbuhan paku yang banyak tumbuh di Indonesia [8]. Tumbuhan tersebut banyak tumbuh di daerah-daerah terbuka, pada tempat yang berbatu di lereng-lereng bukit, dan pada bekas-bekas tembok tua, serta sering ditemukan di tepi sungai yang terbuka maupun yang agak terlindungi. Selain itu juga tumbuh subur baik di dataran rendah maupun di dataran tinggi dengan ketinggian 1200 m di atas permukaan laut [9].

Salah satu senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada tumbuhan paku perak adalah senyawa flavonoid. Jenis flavonoid yang telah ditemukan pada tumbuhan paku perak yakni 2',6'-dihidroksi-4'-metoksi dihidrokhalkon, *kaempferol*, dan *kuersetin*. Flavonoid memiliki berbagai aktivitas sebagai antivirus, antibakteri, antihistamin, dan dapat meningkatkan aktivitas pernapasan, yang semuanya sangat mendukung untuk penyembuhan penyakit radang saluran nafas [10].

Aktivitas mukolitik ekstrak metanol tumbuhan paku perak belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis akan melaporkan hasil uji aktivitas mukolitik *in vitro* terhadap ekstrak metanol tumbuhan paku perak (*P. calomelanos*).

2. Bahan dan metode

2.1. Alat

Rotary vacuum evaporator (Buchi), viskometer Ostwald, neraca analitik, pompa vakum, stopwatch, waterbath, piknometer, labu ukur, gelas kimia, gunting, tabung reaksi, pipet tetes, spatula, bejana maserasi, pisau, botol vial.

2.2. Bahan

Serbuk kering tumbuhan paku perak, diklorometana, metanol, aseton, larutan FeCl₃, pita Mg, HCl pekat, H₂SO₄, CH₃COOH, kloroform, ammonia, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendroff, mukus usus sapi, larutan dapar fosfat pH 7, asetilsistein, tween-80.

2.3. Prosedur penelitian

a. Tahap pengumpulan dan persiapan sampel

Sampel penelitian yang berupa tumbuhan paku perak (*P. calomelanos*) dikumpulkan dari kawasan hutan Kletak, Nongkojajar, Pasuruan, Jawa Timur. Sebelum diteliti lebih lanjut, sampel diidentifikasi di LIPI Kebun Raya Purwodadi. Selanjutnya sampel dibersihkan dari kotoran yang melekat, lalu dikeringkan pada suhu kamar. Sampel yang telah kering digiling menjadi serbuk halus yang siap untuk diekstraksi.

b. Tahap ekstraksi

Sebanyak 2 kg serbuk kering batang tumbuhan paku perak dimaserasi berturut-turut dengan pelarut *n*-heksana selama 3 x 24 jam. Kemudian disaring menggunakan corong buchner. Residu hasil penyaringan dimaserasi kembali dengan pelarut metanol selama 3 x 24 jam. Kemudian disaring menggunakan corong Buchner. Setelah itu, tiap filtrat diuapkan secara vakum dengan rotavapor, sehingga dihasilkan ekstrak padat. Ekstrak metanol padat yang telah diperoleh diuji fitokimia dengan pereaksi FeCl₃ dan Shinoda test.

c. Uji aktivitas mukolitik in vitro

1) Pengumpulan mukus usus sapi

Usus sapi dibersihkan dari kotoran yang melekat, kemudian usus dipotong membujur dan diurut. Selanjutnya lapisan mukosa dikerok perlahan hingga bersih. Mukus yang telah terkumpul digunakan untuk uji aktivitas mukolitik.

2) Pembuatan larutan mukus-dapar fosfat 20% (b/b)

Larutan mukus-dapar fosfat 20% (b/b) dibuat dengan cara mencampurkan mukus sebanyak 20 bagian (dalam bobot) dengan larutan dapar-fosfat pH 7 sebanyak 80 bagian (dalam bobot) sehingga total 100 bagian (dalam bobot). Campuran diaduk sampai homogen [11].

3) Pembuatan larutan kontrol negatif

Larutan kontrol negatif dibuat dengan cara mencampur tween-80 sebanyak 0,5% (b/b) dari berat total atau sebesar 0,15 gram dengan larutan mukus-dapar fosfat hingga diperoleh berat total sebesar 30 gram dan diaduk hingga homogen [11].

4) Pembuatan larutan kontrol positif

Larutan kontrol positif dibuat dengan cara mencampurkan asetilsistein 0,1% sebanyak 0,03 gram dengan tween 80 sebanyak 0,5% (b/b) dari berat total atau sebesar 0,15 gram. Selanjutnya ditambahkan larutan mukus-dapar fosfat hingga diperoleh berat total sebesar 30 gram dan diaduk hingga homogen [11].

5) Pembuatan larutan uji

Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak diklorometana dari batang tumbuhan paku perak dengan konsentrasi 0,2% ; 0,4% ; 0,6% ; 0,8% ; 1% ; 1,2% ; dan 1,4%. Masing-masing larutan uji dibuat dengan mencampurkan ekstrak sebanyak konsentrasi masing-masing dengan tween-80 sebanyak 0,5% (b/b) dari berat total atau sebesar 0,15 gram. Selanjutnya ditambahkan larutan mukus dapar fosfat hingga diperoleh berat total sebesar 30 gram dan diaduk hingga campuran homogen[11].

6) Uji aktivitas mukolitik secara *in vitro*

Uji aktivitas mukolitik dilakukan dengan pengukuran viskositas menggunakan viskometer Ostwald. Larutan kontrol negatif, larutan kontrol positif, dan larutan uji diinkubasi dalam waterbath selama 30 menit pada suhu 37°C. Kemudian larutan uji dimasukkan ke dalam viskometer Ostwald. Selanjutnya dilakukan pengukuran kerapatan menggunakan piknometer. Kemudian dihitung viskositasnya dengan mengalikan data waktu alir dengan kerapatan[11].

d. Teknik analisis data

Aktivitas mukolitik ekstrak metanol tumbuhan paku perak dianalisis secara deskriptif dengan cara membandingkan nilai viskositas ekstrak dengan kontrol positif asetilsistein 0,1%. Data nilai viskositas ekstrak dianalisis dengan ANAVA satu arah, dilanjutkan uji LSD pada analisis *Post-Hoc* untuk mengetahui signifikansi perbedaan harga viskositas larutan antar perlakuan. Semua analisis statistik dilakukan dengan program SPSS.

3. Hasil penelitian dan pembahasan

Sampel yang berupa serbuk halus berwarna coklat dari tumbuhan paku perak *P. calomelanos* sebanyak 2 kg diekstraksi dengan cara maserasi berturut-turut menggunakan pelarut n-heksana dan metanol pada suhu kamar selama 24 jam dan diulang 3 kali. Perendaman selama 24 jam berfungsi untuk memperoleh senyawa bioaktif yang lebih banyak dari tumbuhan tersebut. Ekstrak metanol disaring secara vakum menggunakan corong Buchner sehingga diperoleh ekstrak cair metanol berwarna coklat tua sebanyak 21,697 gram. Ekstrak cair diuapkan pada suhu kamar sehingga diperoleh ekstrak padat. Ekstrak padat metanol yang telah diperoleh diuji fitokimia dengan pereaksi FeCl_3 , menghasilkan hasil positif yang ditunjukkan dengan warna kuning, dan uji Shinoda test pada ekstrak menunjukkan warna hijau kecoklatan. Dengan demikian ekstrak metanol tumbuhan paku perak mengandung senyawa fenolik golongan flavonoid.

Pengujian aktivitas mukolitik dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas mukolitik dari ekstrak yang diperoleh. Dalam penelitian ini uji aktivitas mukolitik dilakukan terhadap mukus usus sapi hal ini dikarenakan mukus sapi memiliki komposisi yang sama terhadap lapisan mukosa pada saluran pernapasan manusia. Mukus yang diperoleh berwarna kecoklatan dan kental. Pembuatan larutan musus dilakukan cara mengencerkan mukus dengan larutan dapar fosfat pH 7. Penggunaan larutan dapar ini bertujuan untuk menjaga mukus agar komposisinya tidak berubah, selain itu sesuai dengan derajat keasaman darah dan lambung atau keadaan netral dalam derajat kesamaan tubuh. Larutan diinkubasi dalam waterbath dengan suhu 37°C agar kondisi larutan uji sesuai dengan kondisi fisiologis suhu tubuh manusia. Karena jika suhu kurang atau lebih dari 37°C maka kekentalan dari larutan akan menurun dan berpengaruh terhadap nilai viskositasnya. Pengujiannya dilakukan menggunakan viskositas Ostwald karena mucus mempunyai tipe aliran non newton dan tergolong pseudoplastis. Hasil uji aktivitas mukolitik disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai viskositas larutan uji

	Viskositas			
	I	II	III	Rata-rata
Kontrol negatif	10,6547	10,6547	10,4470	10.5855
Kontrol positif	7,8762	7,8966	7,8660	7.8796
Larutan uji 0,2%	8,3915	8,1518	8,1518	8.2317
Larutan uji 0,4%	7,8804	7,8804	7,8604	7.8737
Larutan uji 0,6%	7,8567	7,8670	7,8772	7.8670
Larutan uji 0,8%	7,7553	7,7553	7,7655	7.7587
Larutan uji 1%	7,6703	7,6703	7,6600	7.6669
Larutan uji 1,2%	6,9487	6,9294	6,9390	6.9390

	Viskositas			
	I	II	III	Rata-rata
Larutan uji 1,4%	6,5870	6,5870	6,5663	6.5801

Setelah diketahui hasil pengujian terhadap aktivitas mukolitik yang dilihat dari nilai viskositas pada tabel 1 menunjukkan nilai perubahan tiap larutan. Semakin besar konsentrasi suatu larutan memiliki nilai viskositas yang lebih kecil dan waktu alirnya juga kecil dibandingkan dengan kontrol negatif. kemudian data viskositas larutan dianalisis secara statistik menggunakan SPSS dengan uji normalitas untuk mengetahui apakah sampel berdistribusi normal atau tidak dan uji ANAVA satu arah dilanjutkan uji LSD dalam analisis *Post-Hoc* untuk mengetahui signifikan perbedaan viskositas antar kelompok perlakuan. Berdasarkan hasil uji normalitas dan uji homogenitas terdapat perbedaan yang signifikan dengan diperoleh nilai p masing-masing 0,640 dan 0,401. Karena nilai tersebut lebih dari 0,05 maka dapat dinyatakan bahwa data sampel berdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya analisis dilanjutkan dengan uji LSD untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda makna

Tabel 2. Hasil uji LSD pada tiap kelompok perlakuan

	Perlakuan	Probabilitas	Kesimpulan
Kontrol negatif	Kontrol positif	0,000	BB
	Konsentrasi 0,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,4%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,6%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,8%	0,000	BB
	Konsentrasi 1%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,4%	0,000	BB
Kontrol positif	Kontrol negatif	0,000	BB
	Konsentrasi 0,2%	0,004	BB
	Konsentrasi 0,4%	0,511	BTB
	Konsentrasi 0,6%	0,165	BTB
	Konsentrasi 0,8%	0,000	BB
	Konsentrasi 1%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,4%	0,000	BB
Konsentrasi 0,2%	Kontrol negatif	0,001	BB
	Kontrol positif	0,000	BB
	Konsentrasi 0,4%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,6%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,8%	0,000	BB
	Konsentrasi 1%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,4%	0,000	BB
Konsentrasi 0,4%	Kontrol negatif	0,000	BB
	Kontrol positif	0,511	BTB
	Konsentrasi 0,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,6%	0,449	BTB
	Konsentrasi 0,8%	0,001	BB
	Konsentrasi 1,2%	0,000	BB

	Perlakuan	Probabilitas	Kesimpulan
	Konsentrasi 1,4%	0,000	BB
Konsentrasi 0,6%	Kontrol negatif	0,000	BB
	Kontrol positif	0,165	BTB
	Konsentrasi 0,2%	0,030	BB
	Konsentrasi 0,4%	0,449	BTB
	Konsentrasi 0,8%	0,026	BB
	Konsentrasi 1%	0,006	BB
	Konsentrasi 1,2%	0,006	BB
	Konsentrasi 1,4%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,8%	Kontrol negatif	0,000
Kontrol positif		0,000	BB
Konsentrasi 0,2%		0,000	BB
Konsentrasi 0,4%		0,000	BB
Konsentrasi 0,6%		0,000	BB
Konsentrasi 1%		0,000	BB
Konsentrasi 1,2%		0,000	BB
Konsentrasi 1,4%		0,000	BB
Konsentrasi 1%	Kontrol negatif	0,000	BB
	Kontrol positif	0,000	BB
	Konsentrasi 0,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,4%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,6%	0,006	BB
	Konsentrasi 0,8%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,4%	0,000	BB
Konsentrasi 1,2%	Kontrol negatif	0,000	BB
	Kontrol positif	0,048	BB
	Konsentrasi 0,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,4%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,6%	0,006	BB
	Konsentrasi 0,8%	0,000	BB
	Konsentrasi 1%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,4%	0,000	BB
Konsentrasi 1,4%	Kontrol negatif	0,000	BB
	Kontrol positif	0,002	BB
	Konsentrasi 0,2%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,4%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,6%	0,000	BB
	Konsentrasi 0,8%	0,000	BB
	Konsentrasi 1%	0,000	BB
	Konsentrasi 1,2%	0,000	BB

Berdasarkan hasil uji LSD pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa perbandingan antara kontrol negatif dan kontrol positif atau senyawa ekstrak mempunyai perbedaan yang bermakna dengan nilai $p < 0,05$ serta terjadi penurunan viskositas terhadap kontrol negatif. Hal ini sesuai teori dimana jika larutan uji memiliki viskositas yang lebih kecil dibandingkan dengan kontrol negatif (terjadi penurunan) menunjukkan bahwa ekstrak memiliki sifat mukolitik, terjadinya penurunan viskositas karena menunjukkan bahwa asetilsistein dapat mengencerkan dahak melalui pemutusan ikatan disulfida pada struktur mukoprotein dahak. Selanjutnya dibandingkan

dengan kontrol positif untuk mengetahui konsentrasi yang memiliki aktivitas mukolitik yang setara dengan asetilsistein 0,1%. Hasilnya adalah ekstrak dengan konsentrasi 0,4% tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$) terhadap kontrol positif (asetilsistein 0,1%). Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa flavonoid pada ekstrak dengan konsentrasi 0,4% memiliki aktivitas mukolitik yang setara dengan asetilsistein 0,1%.

Aktivitas mukolitik pada tumbuhan paku perak disebabkan oleh adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak metanol tumbuhan paku perak. Senyawa tersebut dapat memecah benang-benang mukoprotein dan mukopolisakarida dari sputum (mukus). Pada mukus terdapat berbagai macam jenis ikatan antar molekul. Gugus aktif dari senyawa dalam ekstrak akan memutus ikatan disulfida pada mukus sehingga dapat menurunkan viskositas mukus.

4. Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan terhadap hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa ekstrak metanol tumbuhan paku perak memiliki aktivitas mukolitik pada uji mukolitik terhadap mukus usus sapi. Ekstrak dengan konsentrasi 0,4% dan 0,6% memiliki aktivitas mukolitik yang setara dengan kontrol positif (asetilsistein 0,1%). Dengan demikian, ekstrak metanol tumbuhan paku perak dapat dijadikan alternatif dalam pengobatan batuk.

Daftar pustaka

- [1] Darmawan, A. 2013. Penyakit Sistem Respirasi. *JMJ*. Vol. 1, No.1, hal: 68-83.
- [2] Yusnabeti, Wulandari, R. A., & Luciana, R. 2010. PM-10 dan Infeksi Saluran Pernapasan Akut pada Pekerja Industri Mebel. *Makara Kesehatan*. Vol. 14, No. 1, hal: 25-30.
- [3] Tjay, T.H. dan Raharja, K. 2007. *Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan, dan Efek Sampingnya*. Edisi 5, Jakarta: PT Elex Media Komputindo.
- [4] Ariani. 2014. Pengaruh Variasi Kadar Ekstrak Etanolik Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus Rosa-sinensis* L.) dalam Sirup terhadap Aktivitas Mukolitik Secara *in Vitro*. Tesis. Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada
- [5] Frandson, R.D. 1993. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- [6] Peng, Y.Y., Liu, F.H., and Ye, J. N. 2004. Determination of Bioactive Flavonoids in *Rhododendron dauricum* L. by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Short Communication, Chromatographia*. 60 (9/10) : 597-602.
- [7] Wulandari, R.L., dkk. 2013. *Aktivitas Mukolitik Fraksi Metanol dari Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (Piper crocotum) pada Mukosa Usus Sapi dan Kandungan Kimianya*. Semarang: Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.
- [8] Hasibuan, H. 2016. Inventaris Jenis Paku-Pakuan (Pteridophyta) di Hutan sebelah Barat Kecamatan Sungai Ambawang Kalimantan Barat. *Protobiont* Vol 5, No 1, 46-58.
- [9] Julita, N. dan Suyatno. 2012. Aktivitas Antibakteri Senyawa Flavonoid dari Tumbuhan Paku Perak (*Pityrogramma calomelanos*). *UNESA Journal of Chemistry*, Vol 1, No 1, pp: 75-79
- [10] Suyatno, Nurul, H., Umami, K., Sari, I.P. 2014. Flavonoids from Indonesian Silver Fern and their Cytotoxicity Against Murine Leukimia P-388 Cells. *Journal of Natural Science Research*, Vol 4, No 15.
- [11] Afiyati, A. dan Murruckmihadi, M. 2013. The Effect of Fraction Containing Alkaloids of Hibiscus Flower (*Hibiscus Rosa-sinensis* L.) Red Variety to Mucolytic Activities in Vitro. *Trad. Med. J.* 18 (3) : 187-194