

# PRODUKSI, KARAKTERISASI, DAN PENETAPAN KADAR $\beta$ -GLUKAN DARI *Saccharomyces cerevisiae* HASIL ISOLASI DARI BERBAGAI JENIS RAGI LOKAL

Mellova Amir, Stifani Sofyani dan Kusmiati\*

Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan

Institut Sains dan Teknologi Nasioanal, Jakarta

Email : mellova.masrizal@gmail.com

Laboratorium Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi,

Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor.

## Abstrak

Telah dilakukan penelitian produksi, karakterisasi dan penetapan kadar  $\beta$ -Glukan dari *S. cerevisiae* hasil isolasi dari berbagai jenis ragi lokal dengan tujuan untuk memperoleh isolat *S. cerevisiae* yang unggul dengan kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa tinggi dan kadar protein rendah sebelum fraksinasi dan setelah fraksinasi. Isolat *S. cerevisiae* dari 3 ragi lokal yaitu RT 3, RT 12, RT 14 dan 1 isolat *S. cerevisiae* dari ragi bermerek SAF diregenerasi dan diinokulasikan ke dalam media pertumbuhan PDA, selanjutnya difermentasi pada media GYP cair hingga kultur sel berumur 6 hari. Biomassa sel diekstraksi untuk mendapatkan  $\beta$ -Glukan, hasil ekstraksi dikeringkan kemudian bobotnya ditimbang (mg) dan dianalisis kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa dan kadar protein dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.  $\beta$ -Glukan *crude* difraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan eluen campuran n-butanol, etanol, air (5:5:4, v/v). Hasil fraksi-fraksi dianalisis kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa dan kadar proteinnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *S. cerevisiae* RT 3 yang diisolasi dari ragi lokal asal Kota Payakumbuh Propinsi Sumatera Barat memberikan hasil terbaik dengan kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa sebesar 6,9042 % dan kadar protein sebesar 3,7065 %. Begitu pula dengan hasil fraksinasi isolat *S. cerevisiae* RT 3 memiliki rasio kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa : kadar protein sebesar 1,1348.

**Kata Kunci :** ragi lokal,  $\beta$ -Glukan, *S. cerevisiae*, isolasi, fraksinasi.

## 1. PENDAHULUAN

$\beta$ -Glukan merupakan homopolimer glukosa yang diikat melalui ikatan  $\beta$ -(1,3) dan  $\beta$ -(1,6)-glukosida. Senyawa ini banyak ditemukan pada dinding sel beberapa bakteri, tumbuhan, dan khamir, seperti *Saccharomyces cerevisiae*.  $\beta$ -Glukan terbukti secara ilmiah sebagai *biological defense modifier* (BDM) dan termasuk kategori *generally recognized as safe* (GRAS) menurut *Food and Drug Administration* (FDA) ( ), serta tidak memiliki toksisitas atau efek samping. Senyawa  $\beta$ -Glukan banyak mendapat perhatian karena banyak manfaatnya untuk kehidupan manusia, diantaranya untuk meningkatkan kekebalan tubuh, mencegah bakteri dan infeksi viral, serta aktivitas antitumor, immunomodulator, anti kanker dan sebagai bahan aktif dalam formulasi sediaan krim kosmetika kulit (..).

*Saccharomyces cerevisiae* merupakan mikroba bersifat nonpatogenik dan nontoksik, sehingga sejak dahulu banyak digunakan dalam berbagai proses fermentasi seperti pembuatan roti, asam laktat dan alkohol. Untuk kultivasi *S. cerevisiae*, digunakan

media yang mengandung gula, seperti molases. Mikroba khamir merupakan galur potensial penghasil beta glukan, karena sebagian besar dinding selnya tersusun atas beta glukan (..).

Dengan banyaknya manfaat senyawa  $\beta$ -Glukan bagi manusia, menjadi dasar untuk mengembangkan  $\beta$ -Glukan, meningkatkan produksi dan aplikasinya. Pada penelitian ini menggunakan tiga isolat *S. cerevisiae* yang diperoleh dari berbagai macam ragi lokal dengan satu ragi bermerek sebagai pembanding. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan penelitian tentang Produksi  $\beta$ -Glukan *Saccharomyces cerevisiae* dengan Sumber Nitrogen Berbeda pada *Air-Lift Fermentor*, dimana produksi  $\beta$ -Glukan tertinggi dengan sumber nitrogen pepton (933,33 mg/L) ( ).

Penelitian ini difokuskan untuk memproduksi  $\beta$ -Glukan dari *S. cerevisiae* yang diisolasi dari sampel ragi lokal. Di berbagai daerah di Indonesia ragi banyak digunakan untuk membuat olahan makanan seperti es tebak, lamang tapai, dan juga minuman arak yang merupakan makanan atau minuman khas daerah. Dari sumber makanan dan

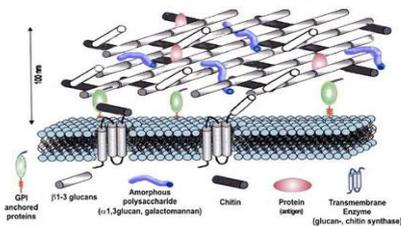
minuman tersebut ragi diisolasi dan dikultur sebagai sumber  $\beta$ -Glukan. Parameter yang diukur yaitu berat kasar  $\beta$ -Glukan (mg), karakterisasi  $\beta$ -Glukan dengan FTIR (*Fourier Transform Infra Red*), kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa yang dianalisis dengan metode Fenol Sulfat menggunakan spektrofotometer UV-Vis diukur pada  $\lambda$  490 nm, dan kadar protein yang dianalisis dengan metode Lowry menggunakan spektrofotometer UV-Vis diukur pada  $\lambda$  750 nm. Kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi  $\beta$ -Glukan *crude* dengan Kromatografi Kolom, hasil fraksi-fraksi dianalisis kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa dan kadar protein.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### *Saccharomyces cerevisiae* (ragi/hamir)

Ragi/khamir adalah kelompok jamur uniseluler yang melakukan reproduksi dengan pembelahan sel aseksual, penguncupan atau proses seksual. Khamir memiliki ukuran yang sangat beragam, dengan panjang berkisar 5-30  $\mu\text{m}$  dan lebar 1-5  $\mu\text{m}$ . Biasanya khamir berbentuk telur, namun ada yang berbentuk memanjang atau berbentuk bola. Setiap spesies mempunyai bentuk yang khas, namun sekalipun dalam biakan murni terdapat variasi yang luas dalam hal ukuran dan bentuk sel-sel individu, tergantung kepada umur dan lingkungan. Khamir tidak dilengkapi dengan flagelum atau organ-organ penggerak lainnya (..).

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) merupakan jenis khamir yang diketahui mensintesis  $\beta$ -Glukan pada dinding selnya. Struktur dinding sel *S. cerevisiae* mengandung protein yang terikat dengan gula sebagai glikoprotein dan manoprotein, serta mengandung manan, kitin dan polisakarida jenis  $\beta$ -1,3-glukan dan  $\beta$ -1,6-glukan yang berfungsi memperkuat struktur sel dan sebagai cadangan makanan.<sup>11</sup>(..)

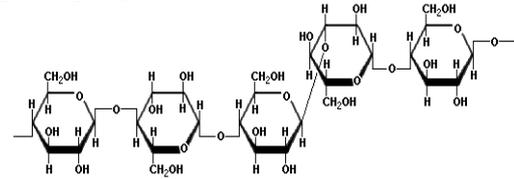


**Gambar 1. Struktur Dinding Sel *S. cerevisiae*.**

### Beta glukan

$\beta$ -Glukan merupakan homopolimer glukosa yang diikat melalui ikatan  $\beta$ -(1,3) dan  $\beta$ -(1,6)-glukosida dan banyak ditemukan dalam dinding sel beberapa bakteri, tumbuhan, dan khamir. Dilihat dari strukturnya  $\beta$ -Glukan merupakan suatu

polisakarida yang terdiri atas ribuan unit glukosa. Unit-unit glukosa pada  $\beta$ -Glukan tersebut dihubungkan dengan ikatan  $\beta$ -glikosidik untuk membentuk rantai utama polimer.  $\beta$ -Glukan merupakan polisakarida yang berlimpah, cabang yang berasal dari rantai glikosidik sangat bervariasi dan dua kelompok utama percabangan ini adalah rantai 1,4 dan 1,6 glikosidik, misalnya  $\beta$ -Glukan yang berasal dari jamur memiliki 1,6 cabang samping, sedangkan yang bakteri memiliki 1,4 cabang samping.



**Gambar 2. Struktur Senyawa Beta Glukan.**

### Analisis

Proses pemisahan dan pemurnian dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Sebelum pemisahan dan pemurnian dilakukan terlebih dahulu analisis dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). untuk menentukan pelarut yang akan digunakan pada saat pemisahan dengan kromatografi kolom. Pada Kromatogram KLT menunjukkan pola pemisahan yang terjadi pada kromatografi kolom.

## 3. BAHAN DAN METODE

### a. Bahan dan Alat

Bahan uji yang digunakan adalah 3 ragi lokal yang berasal dari Padang (RT 3), Tasikmalaya (RT 12), Pekalongan (RT 14), dan satu ragi instant SAF sebagai pembanding. Sedangkan peralatan yang digunakan yaitu timbangan analitik, cawan petri, *laminar air flow*, inkubator, oven-vakum, sentrifus (Hitachi CT6EL), vortex, shaker inkubator, spektrofotometer UV-Vis (Simatzu) spektrofotometer FTIR-8400S.

### b. Pembuatan Media

#### Media regenerasi

Media yang digunakan adalah PDA (Potato Dextrose Agar) dengan menimbang sebanyak 3,8 g PDA dilarutkan dalam 100 ml akuades, dididihkan pada suhu 100°C dan dibagi ke dalam tabung reaksi masing-masing 4 ml. Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah steril tabung dimiringkan dan didinginkan hingga memadat.

#### Media fermentasi

Media fermentasi yang digunakan adalah GYP cair dengan komposisi (b/v) Ekstrak ragi 1%, pepton 2%, glukosa 2%. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan 800 ml akuades. Lalu dibagi ke dalam 16 erlenmeyer masing-masing 50 ml. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.

### c. Produksi beta glukon

1 ml kultur *S. cerevisiae* segar diinokulasikan ke dalam 50 ml media GYP cair, diinkubasi menggunakan shaker inkubator pada suhu 30°C selama 6 hari.

### d. Ekstraksi beta glukon

Kultur sel *S. cerevisiae* berumur 6 hari telah mencapai fase stasioner, diekstraksi untuk mendapatkan  $\beta$ -Glukan. Kultur disentrifius dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 30°C selama 10 menit, kemudian supernatan dibuang dan biomassa dihidrolisis dengan NaOH 0,75 M dalam tangas air pada suhu 75°C selama 6 jam. Hasil hidrolisis disentrifius dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu 30°C selama 15 menit, kemudian supernatan dibuang. Biomassa ditambahkan asam asetat 0,5 M, kemudian disentrifius dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit kemudian supernatan dibuang. Perlakuan dengan asam asetat ini dilakukan sebanyak 3 kali. Biomassa dibilas dengan akuades dan disentrifius dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 2 kali. Biomassa dibilas dengan etanol 70% dan disentrifius dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang. Biomassa dikeringkan dengan oven vakum pada suhu 50°C selama 5-6 jam.

### e. Karakterisasi $\beta$ -Glukan *crude* dengan Fourier Transform Infra Red (FTIR).

Sejumlah 2 mg sampel ekstrak kering  $\beta$ -Glukan ditambahkan 100 mg serbuk KBr, kemudian digerus halus hingga homogen. Campuran ini diproses dengan pencetak khusus hingga diperoleh pelet yang transparan dan direkam spektrumnya pada bilangan gelombang 4000–666  $\text{cm}^{-1}$ .

### f. Analisis Glukosa dengan Metode Fenol-Sulfat

Sejumlah 0,25 ml larutan uji dipipet kemudian ditambah akuades hingga total volume 0,5 ml. Kemudian ditambahkan 0,25 ml fenol 5% dan 1,25 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dalam tabung reaksi, kemudian digojog, diamkan selama 10 menit, kemudian dididihkan pada suhu 100°C selama 15 menit dan

dinginkan. Serapan diukur pada panjang gelombang 490 nm.

### g. Analisis Protein dengan Metode Lowry

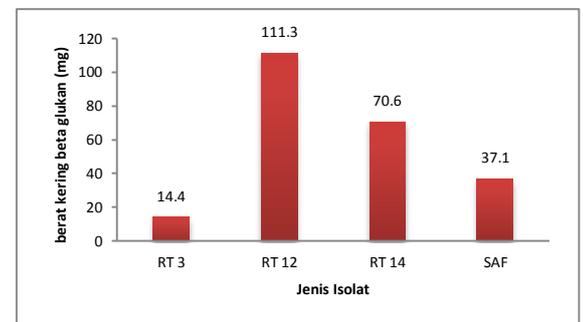
Sejumlah 0,25 ml larutan uji diencerkan dengan akuades hingga 0,5 ml, kemudian ditambahkan 0,25 ml NaOH 1 N didihkan selama 20 menit, kemudian ditambahkan 1,25 ml Larutan pereaksi D (50 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5%, 1 ml  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  1%, 1 ml potasium tatrik 2%), dikocok sampai homogen lalu didiamkan 10 menit, kemudian ditambahkan 0,25 ml Folin Ciocalteu sehingga akan terbentuk warna biru, diamkan selama 30 menit, serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm.

### h. Penetapan Kadar $\beta$ -Glukan ekuivalen Glukosa dan Kadar Protein Hasil Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan absorben silika gel dan eluen yang terdiri dari campuran n-butanol, etanol, air (5:5:4, v/v). Hasil fraksi-fraksi dianalisis kadar  $\beta$ -Glukan ekuivalen glukosa dan kadar proteinnya seperti pada penetapan kadar sebelum fraksinasi.

## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

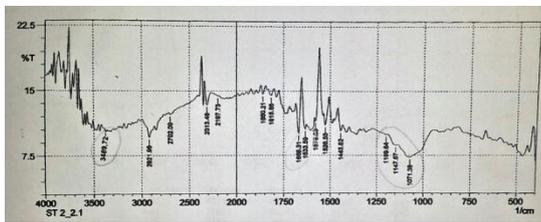
### a. Perhitungan Bobot Kering beta glukon *crude*



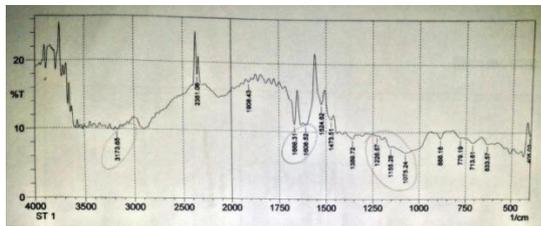
Gambar 3. Histogram jumlah berat kering  $\beta$ -Glukan

Hasil penggunaan empat isolat *S. cerevisiae* menunjukkan bahwa bobot kering  $\beta$ -Glukan tertinggi diperoleh pada isolat *S. cerevisiae* RT 12 dengan berat 111,3 mg, sedangkan yang terendah diperoleh dari isolat *S. cerevisiae* RT 3 dengan berat 14,4 mg. Perbedaan produksi  $\beta$ -Glukan pada empat isolat *S. cerevisiae* bisa disebabkan karena perbedaan sifat genetiknya. Perbedaan genetik ini bisa berpengaruh terhadap hasil fermentasi dari *S. cerevisiae*.

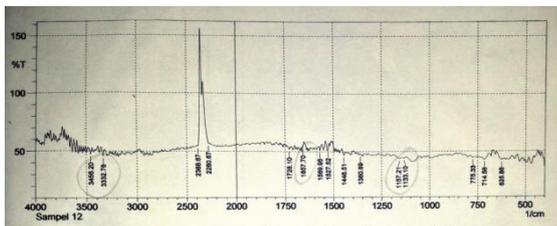
### b. Karakterisasi $\beta$ -Glukan *crude*



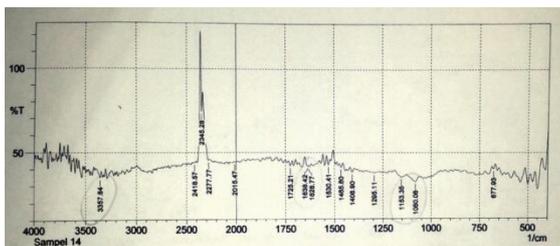
Gambar 4. Spektrum FTIR beta glukam murni



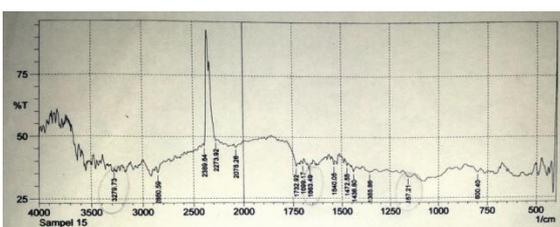
Gambar 5. Spektrum FTIR isolat *S. cerevisiae* RT 3



Gambar 6. Spektrum FTIR isolat *S. cerevisiae* RT 12



Gambar 7. Spektrum FTIR isolat *S. cerevisiae* RT 14



Gambar 8. Spektrum FTIR isolat *S. cerevisiae* SAF

Hasil FTIR diketahui bahwa  $\beta$ -Glukan *crude* dari empat isolat *S. cerevisiae* memiliki gugus fungsi yang sesuai dengan struktur senyawa  $\beta$ -Glukan yang terdiri dari gugus-OH (alkohol), gugus -C-C-C- (alkana), dan gugus R-O-R (eter).

**c. Kadar  $\beta$ -Glukan ekuivalen glukosa**

**Tabel 1. Hasil analisis kadar  $\beta$ -Glukan ekuivalen glukosa dari empat isolat *S.cerevisiae* dengan Spektrofotometer UV-Vis  $\lambda$  490 nm**

<i>S. cerevisiae</i>	kadar $\beta$ -Glukan (%)			
	RT 3	RT 12	RT 14	SAF
Kadar $\beta$ -Glukan ekuivalen Glukosa (%)*	6,9042 <sup>b</sup>	0,7855 <sup>a</sup>	1,0903 <sup>a</sup>	1,6375 <sup>a</sup>

\*hasil rata-rata 4 ulangan

\*\* angka rata-rata yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

Kebutuhan dasar nutrisi bagi mikroorganismenya adalah energi atau sumber karbon, sumber nitrogen, dan unsur anorganik. Analisis kadar  $\beta$ -Glukan ekuivalen glukosa dan kadar protein dilakukan untuk mengetahui penyerapan nutrisi selama proses fermentasi. Pengukuran kadar  $\beta$ -Glukan ekuivalen glukosa menggunakan metode fenol sulfat.

Hasil analisis kadar  $\beta$ -Glukan ekuivalen glukosa tertinggi diperoleh isolat *S. cerevisiae* RT 3 sebesar 6,9042%, sedangkan kadar  $\beta$ -Glukan ekuivalen glukosa terendah diperoleh isolat *S. cerevisiae* RT 12 sebesar 0,7855%.

**d. Kadar protein  $\beta$ -Glukan**

**Tabel 2. Kadar protein pada  $\beta$ -Glukan dari empat isolat *S. Cerevisiae***

<i>S. cerevisiae</i>	Kadar protein (%)			
	RT 3	RT 12	RT 14	SAF
Kadar protein (%)*	3,7065 <sup>c</sup>	0,4432 <sup>a</sup>	0,7768 <sup>a</sup>	2,2335 <sup>b</sup>

\*hasil rata-rata 4 ulangan

\*\*angka rata-rata yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata

Kadar protein pada  $\beta$ -Glukan *crude* diharapkan serendah mungkin untuk aplikasi di bidang farmasi dan kesehatan. Hal ini untuk menghindari konsumen alergi terhadap protein tertentu. Sumber nitrogen dalam media fermentasi digunakan untuk sintesis protein di dalam sel. Adanya penyerapan sel terhadap sumber nitrogen ini menyebabkan kandungan protein di dalam media semakin berkurang dengan lamanya waktu fermentasi.

Hasil analisis kadar protein tertinggi diperoleh isolat *S. cerevisiae* RT 3 sebesar 3,7065%, sedangkan yang terendah diperoleh isolat *S. cerevisiae* RT 12 sebesar 0,4432%.

**e. Rasio kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa : kadar protein hasil fraksinasi**

**Tabel 3. Rasio kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa : kadar protein dari empat isolat *S. cerevisiae* hasil fraksinasi**

Fraksinasi dilakukan untuk memperoleh ekstrak yang lebih murni dengan kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa yang tinggi dan kadar protein yang lebih rendah dibandingkan sebelum fraksinasi. Fraksinasi dilakukan melalui fraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Hasil fraksi kemudian dianalisis lagi kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa dengan metode fenol sulfat dan kadar protein dengan metode Lowry.

Hasil analisis menunjukkan bahwa rasio kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa : kadar protein tertinggi dari isolat *S. cerevisiae* RT 3 sebesar 1,1348 sedangkan rasio kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa : kadar protein terendah dari isolat *S. cerevisiae* RT 14 sebesar 0,8247. Hal ini menunjukkan bahwa setelah difraksinasi, kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa dan kadar protein dari senyawa  $\beta$ -Glukan semakin rendah disebabkan komponen senyawa lain yang terdapat pada  $\beta$ -Glukan *crude* tereliminasi pada proses fraksinasi dengan silika gel menggunakan kromatografi kolom.

**5. SIMPULAN**

Bobot kering  $\beta$ -Glukan tertinggi diperoleh pada isolat *S. Cerevisiae* RT 12 sebesar 111,3 mg, sedangkan yang terendah diperoleh pada isolat *S. cerevisiae* RT 3 sebesar 14,4 mg.

Karakterisasi  $\beta$ -Glukan *crude* dari empat isolat *S. cerevisiae* menggunakan FTIR memperlihatkan bahwa keempat isolat mempunyai gugus fungsi yang sama dengan struktur senyawa  $\beta$ -Glukan.

Isolat *S. cerevisiae* RT 3 yang berasal dari daerah Kota Payakumbuh Sumatera Barat memberikan hasil terbaik dengan kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa sebesar 6,9042 % dan kadar protein sebesar 3,7065%. Begitu pula dengan hasil fraksinasi dimana isolat *S. cerevisiae* RT 3 memiliki rasio kadar  $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa : protein sebesar 1,1348.

**DAFTAR PUSTAKA**

Ha, C., K. Lim, Y. Kim, S. Lim, C. Kim, and H. Chang. **Analysis of Alkali-soluble Glucan Produced *Saccharomyces cerevisiae* by Wild-type and Mutants.** Applied microbiology and Biotechnology 58 (3). 2002. Hal 370-377.

Hunter, K.W.Jr., R.A. Gault, and M.D. Berner. **Preparation of Microparticulate  $\beta$ -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for Use in Immune Potention.** Letters in applied Microbiology 35 (4). 2002. Hal 267-269.

No	<i>S. cerevisiae</i>	Kadar $\beta$ -Glukan ekivalen glukosa (%)*	Kadar Protein (%)*	Rasio glukosa : protein
1.	RT 3	3,3119	2,9183	1,1348
2.	RT 12	0,3497	0,4085	0,8564
3.	RT 14	0,5361	0,6501	0,8247
4.	SAF	0,8956	0,8585	1,0432

Javmen, A., Grigiskis. S, and Gliebute. R.  **$\beta$ -Glucan Extraction from *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Using *Actinomyces rutgersensis* 88 Yeast Yyzing Enzymatic Complex.** Biologija 58 (2). 2012. Hal 51-59.

Kusmiati., A. Thontowi., dan S. Nuswantara. **Produksi  $\beta$ -Glukan *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media dengan Sumber Nitrogen Berbeda pada *Air-Lift Fermentor*.** Biodiversitas, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong, 2007. Hal 253.

Riadi, L., **Teknologi Fermentasi.** Yogyakarta, Graha Ilmu, 2007. Hal 4-13.

Kusmiati., A. Thontowi., dan S. Nuswantara. **Efek Sumber Karbon Berbeda terhadap Produksi  $\beta$ -Glukan oleh *Saccharomyces Cerevisiae* pada Fermentor Air Lift.** Jurnal Natur Indonesia, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong, 2011. Hal 138-139.

Pelczar, M., dan Chan., **Dasar-dasar Mikrobiologi,** Edisi 1. Depok, Universitas Indonesia, 2008. Hal 132.

Kusmiati., F. Rachmawati., dan S. Siregar. **Produksi Beta-1,3 Glukan dari *Agrobacterium* dan Aktivitas Penyembuhan Luka Terbuka Pada Tikus Putih.** Makara, Sains, Vol. 10 No. 1, Bogor, 2006. Hal 24-31.

Fessenden & Fessenden., **Organic Chemistry, Third Edition,** Wardsworth, Inc., Belmont, California 94002 Massachuset, USA, 1986.

Cheesman., IM and R. Malcom Brown, Jr., **Microscopy Of Curdlan Structure.** Departement of Botany, the University of Texas at Austin, 2000.

Venkatachalam. G., S. Gummadi., and M. Doble. **Cyclic  $\beta$ -Glucans from Microorganisms**. SpringerBriefs in Microbiology, DOI: 10.1007/978-3-642-32995-1\_4, The Author(s). 2013.

Harmita., **Analisis Fisikokimia**, Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia. 2006. Hal 16-17.