

UJI AKTIVITAS *REPELLENT* FRAKSI KLOOROFORM EKSTRAK ETANOL DAUN MIMBA (*Azadirachta indica* A.Juss) TERHADAP NYAMUK *Aedes aegypti*

Sri Susilowati¹⁾, Fransiska Vita Kurniawati¹⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

INTISARI

Demam berdarah adalah penyakit yang disebabkan oleh virus dengue melalui perantara nyamuk *Aedes aegypti*. Upaya penanggulangan dapat dilakukan dengan mencegah gigitan nyamuk menggunakan *repellent*. Ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) diketahui mempunyai aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas *repellent* fraksi kloroform ekstrak etanol daun mimba (FKEM) terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.

Ekstrak etanol daun mimba dibuat dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% dan dilanjutkan fraksinasi menggunakan kloroform. Penelitian dilakukan pada 5 kelompok yaitu kontrol positif (DEET 13%), kontrol negatif (paraffin cair) dan ketiga seri konsentrasi FKEM yaitu 5%, 10% dan 20%. Data yang diperoleh berupa jumlah nyamuk yang hinggap, pengamatan selama 6 jam. Besarnya aktivitas *repellent* diperoleh dari nilai daya proteksi. Analisa data digunakan Anova 2 jalan. Nilai EC90 diperoleh melalui analisa probit dengan taraf kepercayaan 95%. Identifikasi senyawa terpenoid yang terkandung dalam FKEM digunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Hasil penelitian menunjukkan FKEM memiliki aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*. Rata-rata daya proteksi selama 6 jam pada kelompok kontrol positif dan FKEM konsentrasi 5%, 10% dan 20% yaitu 92,43%, 66,76%, 76,90% dan 88,35%. Lamanya perlakuan selama 6 jam menyebabkan penurunan daya proteksi pada semua kelompok perlakuan. Konsentrasi FKEM yang efektif menolak 90% populasi nyamuk *Aedes aegypti* (EC₉₀) selama 6 jam perlakuan yaitu 26,1%. Hasil identifikasi menunjukkan FKEM mengandung terpenoid.

Kata kunci: fraksi kloroform, mimba, *repellent*, *Aedes aegypti*

ABSTRACT

Dengue haemorrhagic fever is a disease caused by dengue virus by mediator *Aedes aegypti*. The effort of overcoming this disease could be done by preventing the mosquito from biting using repellent. One of natural repellents is neem (*Azadirachta indica* A.Juss). This study aimed to determine the repellent activity of chloroform fraction of ethanolic extract neem leaf against *Aedes aegypti* mosquito.

Extraction neem leaf done using ethanol 96% by maceration method and followed fractionation with chloroform. This study was conducted in 5 groups, positive control (DEET 13%), negative control (liquid paraffin) and three series concentrations of chloroform fraction of ethanol extract neem leaf; they were 5%, 10% and 20%. Repellent activity was carried out by counting number of mosquitoes alighted. The amount of repellent activity was obtained from the protection value which was then analyzed using two-ways Anova. The EC90 value gained from probit analysis at significance of 95%. Identification of chemical compound of chloroform fraction of ethanolic extract neem leaf was done using thin layer chromatography (TLC).

The results showed that chloroform fraction of ethanolic extract neem leaf had repellent activity against *Aedes aegypti* mosquito. The average protection value for 6 hours in positive control group and chloroform fraction of ethanolic extract neem leaf at 5%, 10% and 20% concentration were 92,43%, 66,76%, 76,90% and 88,35%. The 6-hours treatment had caused decrease in protection value in all of treatment groups. The effective concentration of chloroform fraction ethanolic extract neem leaf to repel 90% population of *Aedes aegypti* mosquito for 6 hours

treatment was 26,1%. The chemical compound of chloroform fraction of ethanolic extract neem leaf was terpenoid.

Keyword: repellent, chloroform fraction of ethanolic extract neem leaf, *Aedes aegypti*

PENDAHULUAN

Masalah penyakit demam berdarah dengue (DBD) di Indonesia merupakan masalah yang klasik, yaitu kejadiannya hampir dapat dipastikan setiap tahun, khususnya di awal musim penghujan (Hadinegoro dan Satari, 1999). Penyakit ini ditularkan oleh suatu vektor yaitu nyamuk *Aedes aegypti* dan juga oleh nyamuk kebun (*Aedes albopictus*). Nyamuk *Aedes aegypti* mempunyai kebiasaan menggigit berulang-ulang (*multiple biter*), yaitu dapat menggigit beberapa orang secara bergantian dalam waktu singkat, sehingga sangat berpotensi menularkan virus ke beberapa orang dalam waktu yang singkat.

Cara menghindari nyamuk yang paling baik adalah dengan pemakaian anti nyamuk yang berbentuk lotion, krim ataupun pakaian yang dapat melindungi tubuh dari gigitan nyamuk. Hampir semua lotion anti nyamuk yang beredar di Indonesia berbahan aktif DEET (*diethyl metatoluamid*) yang merupakan bahan kimia sintetis beracun dalam konsentrasi 10-15% (Gunandini, 2006).

DEET merupakan bahan kimia beracun yang berbahaya khususnya bagi anak-anak dan juga orang dewasa apabila penggunaannya kurang hati-hati. DEET menempel pada kulit selama 8 jam (tidak larut dalam air) serta terserap secara sistemik ke tubuh melalui kulit menuju sirkulasi darah. Hanya 10-15% yang dapat terbuang melalui urin. Dalam aturannya, pemakaian hanya diperbolehkan sekali dalam sehari dan tidak digunakan pada kulit luka atau di bawah baju karena dapat menetrasi ke dalam jaringan kulit. Suatu penelitian yang dilakukan oleh *American Academy of Paediatric* pada tahun 2003 menyatakan bahwa lotion yang mengandung 10% DEET hanya efektif dalam waktu 2 jam, sedangkan yang mengandung 24% DEET hanya dapat bertahan selama 5 jam. Di Indonesia, lotion anti nyamuk yang mengandung DEET 10-15% diklaim oleh produsennya (pada kemasan) dapat bertahan selama 6-8 jam. Peraturan pemerintah melalui Komisi Pesticida Departemen Pertanian (1995) mensyaratkan bahwa suatu lotion anti nyamuk dapat dikatakan efektif apabila daya proteksinya paling sedikit 90% dan mampu

bertahan selama 6 jam (Komisi Pesticida Departemen Pertanian, 1995).

Trend di dunia saat ini adalah dengan slogan *back to nature*, yaitu semangat hidup sehat dengan kembali ke alam atau menggunakan bahan alami, termasuk dalam usaha pencegahan penyakit demam berdarah. Salah satu tumbuhan yang berkhasiat obat dan dapat digunakan sebagai pencegahan penyakit demam berdarah yaitu mimba. Tanaman dari keluarga Meliaceae ini mempunyai potensi sebagai pestisida nabati dan telah dikenal luas oleh masyarakat (Kardinan, 2003).

Kandungan bahan aktif mimba terdapat di seluruh bagian tanaman, tetapi kandungan yang paling tinggi terdapat pada bijinya. Mimba dapat digunakan untuk mengendalikan hama serangga, tetapi aman bagi manusia dan hewan peliharaan. Tanaman ini tidak memiliki sifat langsung mematikan, tetapi bereaksi terhadap hama dengan cara mengganggu perilaku seperti makan, berkumpul, pertumbuhan dan reproduksi. Selain sebagai pestisida nabati, mimba juga dapat digunakan untuk penyembuhan penyakit kulit, antiinflamasi, antibakteri, antidiabetes dan penyakit kardiovaskular. Ekstrak etanol daun mimba mempunyai aktivitas *repellent* yang hampir setara dengan DEET 12,5% pada konsentrasi 80% (Laila, 2005). Penggunaan mimba yang berlebihan atau pada dosis yang besar dapat menimbulkan efek toksisitas yaitu iritasi pada mata dan jaringan lunak serta kemungkinan sebagai penyebab konjungtivitas dan inflamasi (Sudarsono dkk, 2002).

Penyederhanaan kandungan senyawa aktif dapat dilakukan melalui tahapan fraksinasi dari ekstrak. Senyawa aktif yang diduga berkontribusi terhadap aktivitas *repellent* adalah senyawa non polar seperti terpenoid. Berdasarkan informasi tersebut maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah FKEM memiliki aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti* dan mempunyai efek yang setara dengan DEET pada konsentrasi yang lebih kecil daripada ekstraknya, sehingga dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memperoleh suatu produk yang memiliki efektifitas tinggi namun dengan toksisitas yang rendah pada manusia sehingga dapat

digunakan sebagai alternatif yang terbaik untuk mencegah penyakit DBD.

METODE PENELITIAN

Bahan: Daun mimba, diperoleh dari kebun Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Nyamuk *Aedes aegypti* betina (3-5 hari), diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian Vektor dan Reservoir Penyakit Salatiga. DEET 13% (dalam sediaan *Soffell* lotion). Bahan kimia, jika tidak dinyatakan lain berkualitas farmasetik yaitu etanol 96%, kloroform, paraffin cair, toluen p.a, etil asetat p.a, silikagel 60 F254, terpineol p.a, vanilin asam sulfat p.a.

Alat : Seperangkat alat gelas, viskotester Rion VT-043E, timbangan elektronik Ohaus AR 2140 dengan kepekaan 0,1 mg, kurungan nyamuk, pengayak serbuk no. 40, mortir dan stamper.

Jalannya Penelitian

Ekstraksi daun mimba digunakan metode maserasi. Daun segar sebanyak 10 kg dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C

menjadi 999,5 gram simplisia daun kering. Maserasi digunakan pelarut etanol 96% sebanyak 5 liter. Maserasi dilakukan selama 3 hari dan dilanjutkan evaporasi hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes, 1979).

Fraksinasi ekstrak etanol daun mimba digunakan metode partisi cair-cair. Ekstrak kental etanol yang diperoleh yaitu sebanyak 81 gram kemudian disuspensikan dengan air hingga volume 500 ml dan dipartisi dengan kloroform sebanyak 3 kali masing-masing sebanyak 250 ml. FKEM yang diperoleh yaitu seberat 30,56 gram dan diperoleh rendemen sebesar 3,06%.

Uji aktivitas repellent: Pengujian aktivitas repellent FKEM ini menggunakan serangga uji nyamuk *Aedes aegypti* betina berumur 3-5 hari yang telah dipuaskan selama 24 jam. Pada uji ini digunakan 5 kelompok perlakuan yaitu 3 kelompok untuk ketiga seri konsentrasi FKEM, satu kelompok kontrol positif dan satu kelompok kontrol negatif. Masing-masing kelompok diuji dengan 5 kali replikasi. Pembagian masing-masing kelompok terlihat pada Tabel I

Tabel I. Pembagian kelompok uji aktivitas repellent FKEM

Bahan (gram)	Kontrol negatif	Kontrol positif	Konsentrasi I	Konsentrasi II	Konsentrasi III
DEET 13%	-	15	-	-	-
Ekstrak	-	-	0,75	1,5	3
Paraffin cair	15	-	14,25	13,5	12

Keterangan:

Kontrol positif : DEET 13% (dalam sediaan *Soffell* lotion)

Konsentrasi I : FKEM konsentrasi 5%

Konsentrasi II : FKEM konsentrasi 10%

Konsentrasi III : FKEM konsentrasi 20%

Setiap perlakuan diuji dengan cara dioleskan ke salah satu tangan sebanyak 3 gram, sedangkan tangan yang lain sebagai kontrol negatif. Secara bergiliran tangan dimasukkan ke dalam kurungan nyamuk yang berisi 50 ekor nyamuk betina. Pengujian dilakukan selama 5 menit dan lama pengujian hingga 6 jam. Jumlah nyamuk yang hinggap dihitung pada setiap kali usikan (Kardinan, 2007).

Analisa data

Data yang diperoleh berupa jumlah nyamuk yang hinggap pada kelompok kontrol negatif dan perlakuan kemudian dianalisa secara

statistik menggunakan Anova 2 jalan dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan pada setiap perlakuan sehingga diketahui ada atau tidaknya aktivitas repellent pada kelompok perlakuan (Uyanto, 2009). Selanjutnya dihitung daya proteksi masing-masing perlakuan pada tiap-tiap jam untuk mengetahui besarnya aktivitas repellent pada setiap perlakuan dengan rumus (Komisi Pesticida, 1995):

$$\text{Daya proteksi} = \frac{\sum \text{nyamuk yang hinggap pada kontrol negatif} - \sum \text{nyamuk yang hinggap pada perlakuan}}{\sum \text{nyamuk yang hinggap pada kontrol negatif}} \times 100\%$$

Selanjutnya dihitung EC90 yaitu konsentrasi FKEM yang dapat menolak populasi nyamuk sebesar 90% selama 6 jam perlakuan menggunakan analisa probit dengan taraf kepercayaan 95% (Prabawati, 2010).

Identifikasi senyawa aktif daun mimba :

KLT dilakukan untuk menegaskan adanya terpenoid dalam FKEM. Pada uji aktivitas *repellent* FKEM terhadap nyamuk *Aedes aegypti* ini yang dicurigai sebagai senyawa yang berkhasiat *repellent* adalah terpenoid saja, maka KLT dilakukan pada identifikasi terpenoid saja.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Karakteristik FKEM yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu berwarna hijau tua kehitaman, konsistensi sangat kental dengan viskositas 600 dPaS dan bau seperti daun mimba segar dan menyengat. Sepuluh kilogram daun mimba basah setelah dikeringkan beratnya menjadi 999,53 gram. Setelah diekstraksi dan difraksinasi diperoleh FKEM seberat 30,56 gram dengan rendemen 3,06%.

Uji Aktivitas *Repellent*

Hasil penelitian (Tabel II) menunjukkan bahwa rata-rata jumlah nyamuk yang hinggap dari jam ke 0 sampai dengan jam ke 6 pada kelompok perlakuan FKEM lebih sedikit daripada kelompok kontrol negative ($p < 0,05$). Hal ini membuktikan bahwa FKEM memiliki aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*. Besarnya aktivitas *repellent* yang dimiliki oleh setiap kelompok perlakuan dilihat dari nilai daya proteksi masing-masing

perlakuan. Hasil penelitian (Tabel III) menunjukkan bahwa kelompok perlakuan DEET memiliki rata-rata daya proteksi yang tertinggi dibandingkan semua kelompok perlakuan dan kelompok FKEM konsentrasi 20% memiliki daya proteksi yang lebih tinggi dibandingkan kelompok FKEM konsentrasi 5% dan 10%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi FKEM maka semakin besar pula daya proteksi terhadap nyamuk *Aedes aegypti* yang berarti semakin besar pula aktivitas *repellent*-nya. Namun dengan lamanya perlakuan yaitu selama 6 jam terjadi penurunan daya proteksi pada semua kelompok perlakuan, hal ini kemungkinan disebabkan oleh menguapnya FKEM oleh udara sehingga bau menyengat yang dimiliki oleh FKEM menjadi berkurang dan mengakibatkan terjadinya penurunan daya proteksi pada semua kelompok perlakuan.

Perhitungan EC90 diperlukan untuk mengetahui konsentrasi FKEM yang efektif menolak 90% populasi nyamuk *Aedes aegypti* selama 6 jam pengamatan. Hal ini disebabkan adanya persyaratan dari Komisi Pestisida, bahwa senyawa aktif atau sediaan uji dianggap poten sebagai *repellent* nyamuk jika memiliki daya proteksi sebesar 90% selama penggunaan 6 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi FKEM 20% mampu memberikan daya proteksi sampai dengan 90% hanya sampai jam ke 2 pengamatan saja (Tabel III). Berdasarkan hasil tersebut tidak ditemukan konsentrasi yang mampu memberikan daya proteksi hingga 90% selama 6 jam pengamatan, sehingga digunakan analisa probit untuk memperoleh EC₉₀ (Tabel IV dan Gambar 1).

Tabel II. Rata-rata jumlah nyamuk yang hinggap pada masing-masing perlakuan setiap jam.

Kelompok perlakuan	Rata-rata jumlah nyamuk yang hinggap pada jam ke-						
	0	1	2	3	4	5	6
Kontrol negatif	24,40	24,40	25,80	25,20	28,40	28,20	27,80
Kontrol positif	0,40*	0,60*	1,80*	1,20*	2,60*	3,20*	4,00*
CI	4,40*	9,00*	10,00*	10,60*	10,20*	9,60*	10,40*
CII	4,60*	5,80*	5,40*	6,20*	6,20*	7,00*	7,20*
CIII	1,00*	1,20*	2,60*	3,80*	3,60*	3,20*	4,20*

Keterangan:

Kontrol negatif : perlakuan dengan paraffin cair

Kontrol positif : perlakuan dengan DEET 13% (dalam sediaan *Soffell* lotion)

CI : FKEM 5%

CII : FKEM 10%

CIII : FKEM 20%

(*) Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan bermakna terhadap kelompok kontrol negatif pada taraf kepercayaan 95%.

Gambar 1 menunjukkan bahwa probit tersebut FKEM dapat menolak 90% 90% terdapat pada konsentrasi 26,1% populasi nyamuk *Aedes aegypti* hingga jam (antilog 1,417) sehingga pada konsentrasi ke-6.

Tabel III. Rata-rata daya proteksi masing-masing perlakuan setiap jam

Perlakuan	Rata-rata daya proteksi pada jam ke- (%)						
	0	1	2	3	4	5	6
Kontrol (+)	97,75 ^a	97,60 ^b	93,68 ^c	95,16 ^d	89,93 ^{ab}	87,92 ^{abd}	84,99 ^{abcd}
CI	83,07 ^a	66,88 ^a	64,36 ^a	62,44 ^a	63,34 ^a	64,65 ^a	62,60 ^a
CII	81,89 ^a	77,43 ^a	78,63	74,33	79,50	73,64 ^a	72,92 ^a
CIII	95,93 ^a	91,82 ^b	89,76 ^a	84,64 ^a	85,35 ^a	87,01 ^a	83,98 ^{ab}

Keterangan:

Kontrol (+) : perlakuan dengan DEET 13% (dalam sediaan *Soffell* lotion)

CI : FKEM 5%

CII : FKEM 10%

CIII : FKEM 20%

Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada konsentrasi yang sama pada uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.

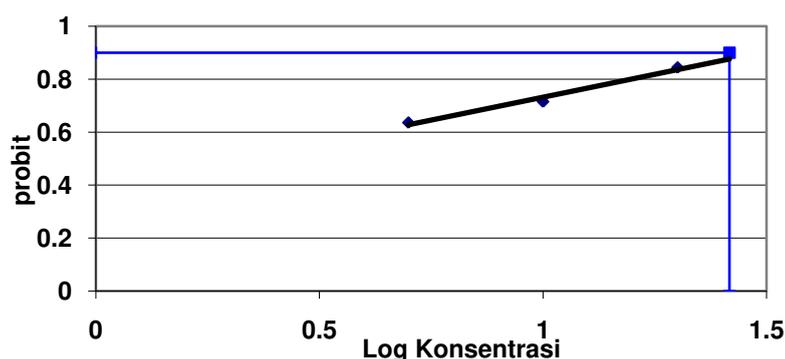
Tabel IV. Hasil analisa probit FKEM

Konsentrasi (%)	Rata-rata daya proteksi pada jam ke-6 (%)	Probit	Persamaan garis*	EC90
5	62,580	0,636	$Y = BX + A$	
10	72,920	0,715	$Y = 0,04X$	26,10%
20	83,976	0,844	+ 0,13	

*) merupakan persamaan garis antara konsentrasi terhadap rata-rata daya proteksi pada jam ke-6

Penelitian yang dilakukan Laila (2005) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun mimba memiliki aktivitas *repellent* pada konsentrasi 80%. Hasil EC_{90} sebesar 26,1% dalam penelitian ini membuktikan bahwa FKEM memiliki efektifitas *repellent* dengan konsentrasi yang lebih kecil dari estraknya. Hal ini disebabkan senyawa aktif yang

terkandung dalam fraksi lebih sedikit daripada ekstrak. Ketika metoda dan pelarut yang digunakan dalam penyarian tepat maka dapat diperoleh senyawa aktif yang tepat pula dalam memberikan kontribusi terhadap aktivitas *repellent*.



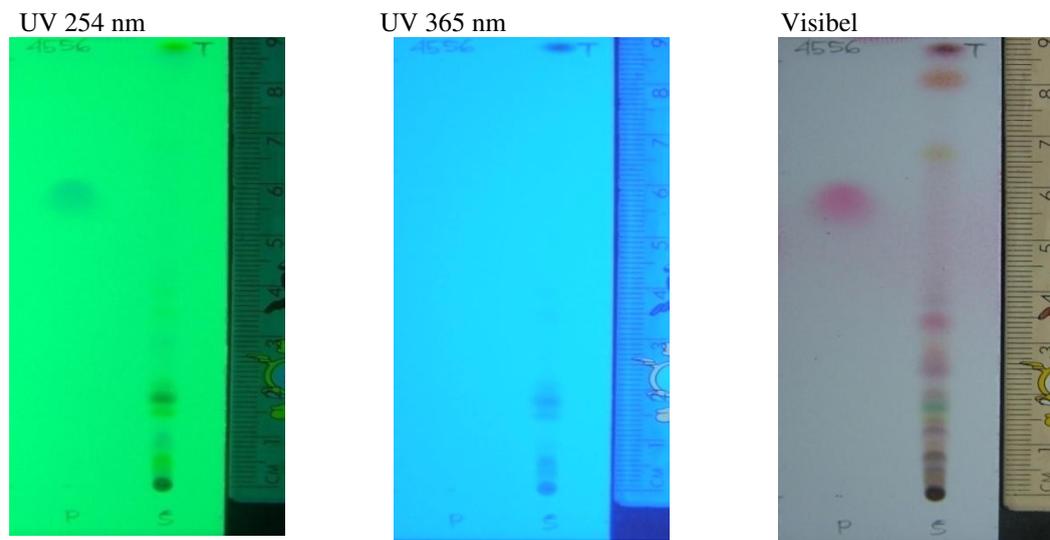
Gambar 1. Grafik log konsentrasi FKEM vs probit

Hasil analisis korelasi regresi log konsentrasi FKEM terhadap probit diperoleh persamaan reaksi $Y = 0,35X + 0,39$ dengan nilai $r = 0,98$. Nilai koefisien korelasi yang didapatkan positif, hal ini menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi sebanding dengan daya proteksi.

Identifikasi Senyawa Aktif FKEM

Kromatografi lapis tipis dilakukan untuk menegaskan adanya senyawa terpenoid

dalam FKEM. Fase diam yang digunakan yaitu silikagel 60 F254 dan fase gerak campuran toluen dan etil asetat dengan perbandingan 93:7. Pereaksi vanilin asam sulfat digunakan sebagai penampak bercak dengan pembanding terpineol yang didapatkan dari produk *roth* (Jerman). Hasil kromatogram dapat dilihat pada Gambar 2



Gambar 2. Kromatogram identifikasi terpenoid FKEM

Warna spot terpenoid di visibel (S)	: Merah violet
Rf terpenoid terdeteksi	: 0.32 dan 0.41
Pembanding (P)	: Terpeneol

Dari hasil kromatogram di atas tampak bahwa FKEM memiliki jarak pengembangan yang mendekati terpeneol dengan nilai Rf 0,32 dan 0,41. Hal ini membuktikan bahwa di dalam FKEM terdapat senyawa terpenoid yang ditunjukkan dengan warna spot yang berpendar atau tampak pada sinar visibel yaitu merah violet.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. FKEM memiliki aktivitas *repellent* terhadap nyamuk *Aedes aegypti*.
2. Konsentrasi FKEM yang efektif menolak 90% populasi nyamuk *Aedes aegypti* hingga 6 jam pengujian (EC90) yaitu sebesar 26,1%.
3. FKEM mengandung senyawa terpenoid.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sifat fisik dan kimia senyawa terpenoid yang terdapat dalam daun mimba sehingga dapat diaplikasikan dalam bentuk sediaan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui toksisitas FKEM untuk penggunaan jangka panjang pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- American Academy of Paediatric, 2003, *the insect repellent DEET*, <http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemical/deet.htm>, diakses 8 Februari 2009.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979, *Farmakope Indonesia*, edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 11, 33.
- Gunandini, DJ., 2006, Bioekologi dan Pengendalian Nyamuk Sebagai Vektor Penyakit, *Prosiding Seminar Nasional Pestisida Nabati III*, Balitro, Bogor.
- Hardinegoro, S., dan Satari, H., 1999, *Demam Berdarah Dengue*, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, 17.
- Kardianan, A., 2003, *Tanaman Pengusir Dan Pembasmi Nyamuk*, Agromedia Pustaka, Jakarta, 1-6, 23-24, 30-31.
- Kardianan, A., 2007, Potensi Selasih sebagai Repellent terhadap Nyamuk *Aedes Aegypti*, *Jurnal Litri*, 13(2).
- Komisi Pestisida Departemen Pertanian, 1995, *Metode Standar Pengujian Efikasi Pestisida*, Departemen Pertanian, Jakarta, 4/9-95.
- Laila, N., 2005, Uji Efektifitas Repelan Lotion Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) Terhadap

- Nyamuk *Aedes aegypti*, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta..
- Prabawati, A., 2010, *Panduan Aplikatif dan Solusi Mengolah Data Statistik Hasil Penelitian dengan SPSS 17*, Wahana Computer, Semarang, 203-213.
- Sudarsono, P.N., Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus, I. A., 2002, *Tumbuhan Obat II (Hasil penelitian, Sifat-sifat dan Penggunaan)*, UGM Jogjakarta, 19-21.
- Uyanto, S., 2009, *Pedoman Analisis Data dengan SPSS*, Edisi Ketiga Cetakan Pertama, Graha Ilmu, Yogyakarta, 203-217,