

## TOKSISITAS DAN KARAKTERISASI GUGUS FUNGSI DAUN SISIK NAGA (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl.)

Frengky Anri Bali<sup>1)</sup>, Fatimawali<sup>1)</sup>, dan Frenly Wehantouw<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

### ABSTRACT

The purpose of this study was to determine LC<sub>50</sub> sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl) epiphytic leaf extract using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), and to know the characteristics of functional groups contained in the extract of the most toxic fraction. The method used in this study was Maceration and fractionation. The implementation of toxicity test used BSLT method. The toxicity test was then performed the isolation of compounds by thin layer chromatography (TLC), and then determined the characteristics of functional groups with spectrophotometer Fourier Transform Infra Red (FTIR). The result showed that the most toxic fraction has LC<sub>50</sub> values of 15.71 ppm which has the potential as anti-cancer. The result of the isolation of the most toxic fraction obtains at least seven compounds, then identified by FTIR spectrophotometer suspected this fraction contains amine functional groups and amide (N-H), phenol, alcohol monomers, alcohol hydrogen bonds (O-H), alkanes, alkenes (C-H), aldehyde, ketone, carboxylic acid, ester (C=O), alcohol, ether, carboxylic acid and ester (C-O).

Key words : Toxicity, Characterization, Fractionation, Sisik Naga epiphytic leaf

### ABSTRAK

Tujuan penelitian ini yaitu menentukan LC<sub>50</sub> ekstrak epifit daun sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl) menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan mengetahui karakteristik gugus fungsi yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi paling toksik. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu maserasi dan fraksinasi. Pelaksanaan uji toksisitas menggunakan metode BSLT. Hasil uji toksisitas fraksi paling toksik selanjutnya dilakukan isolasi senyawa dengan kromatografi lapis tipis (KLT), kemudian ditentukan karakteristik gugus fungsinya dengan spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Hasil penelitian menunjukkan fraksi paling toksik mempunyai nilai LC<sub>50</sub> sebesar 15,71 ppm yang berpotensi sebagai anti kanker. Hasil isolasi dari fraksi paling toksik didapat paling sedikit tujuh senyawa, hasil identifikasi dengan spektrofotometer FTIR diduga fraksi ini mengandung gugus fungsi amina dan amida (N-H), fenol, monomer alkohol, alkohol ikatan hydrogen (O-H), alkana dan alkena (C-H), aldehida, keton, asam karboksilat dan ester (C=O), alkohol, eter, asam karboksilat dan ester (C-O).

Kata kunci : Toksisitas, Karakterisasi, Fraksinasi, Daun Epifit Sisik Naga

## PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sekitar 30.000 spesies, sekitar 940 di antaranya digunakan sebagai tanaman obat. Masyarakat Indonesia telah lama memanfaatkan tanaman obat sebagai obat tradisional. Obat tradisional ialah bahan atau ramuan bahan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan, hewan, dan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun-temurun telah digunakan untuk pengobatan.

Salah satu tanaman obat yang ada di Indonesia ialah epifit. Epifit merupakan tumbuhan yang hidup menumpang tanpa mengambil makanan dari inangnya. Beberapa epifit khas menempati stratum tertentu pada inangnya, tetapi kebanyakan menempati semua strata mulai dari bawah, tengah sampai tajuk pohon. Epifit dapat menempel pada batang, dahan, daun, pohon, perdu, dan liana (Smith, 1979).

Tumbuhan paku epifit merupakan tumbuhan yang memiliki nilai manfaat bagi kehidupan sehari-hari manusia. Nilai manfaat tumbuhan paku epifit selain untuk keperluan media pembelajaran yang dapat diteliti dan dipelajari, nilai manfaat tumbuhan paku epifit juga dapat digunakan sebagai tanaman hias, obat-obatan, kerajinan maupun makanan, salah satu epifit yang digunakan sebagai obat yaitu paku sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl) merupakan tumbuhan yang memiliki aktifitas antioksidan (Dalimunthe dan Anjelisa, 2011). Secara empiris masyarakat menggunakan daun paku sisik naga ini untuk mengobati penyakit gondok, batuk darah, keputihan, kencing nanah, reumatik, sakit kuning, sariawan, dan anti kanker (Malinda, 2013).

Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), merupakan salah satu uji untuk mengetahui potensi anti kanker dari bahan alam, metode ini sederhana, cepat, murah, dan dapat dipercaya. Suatu ekstrak dinyatakan bersifat toksik menurut metode BSLT jika memiliki  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ . Jika hasil uji BSLT menunjukkan bahwa

ekstrak tumbuhan bersifat toksik maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa sitotoksik tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat alternatif anti kanker dan Jika hasil uji BSLT menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan tidak bersifat toksik maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut untuk meneliti khasiat-khasiat lain dari ekstrak tersebut (Meyer, dkk. 1982).

## METODOLOGI PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan ialah daun epifit sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl) yang diambil di daerah sekitar Universitas Sam Ratulangi Kota Manado. Selanjutnya sampel dibersihkan dan dikering anginkan hingga sampel kering. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak daun epifit sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl), etanol 96%, plat KLT GF<sub>254</sub>, metanol (*Merck*), etil asetat (*Merck*), asam asetat (*Merck*), butanol (*Merck*), kloroform (*Merck*), amoniak (*Merck*), asam sulfat (*Merck*), air laut, larva *Artemia salina* L.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kain hitam, alat-alat gelas (Pyrex), corong pisah, timbangan digital (AND), pipet ukur, loop, aerator, lampu, oven (Mommert), *water bath* (Eyela), *vacum rotary evaporator* (Eyela N-1000), Spektrofotometer Shimadzu 1800 dan Spektrofotometer FTIR Shimadzu Prestige 21.

### Persiapan Sampel

Daun sisik naga sebanyak 2500 g dibersihkan, dicuci dengan air mengalir, ditiriskan, dan dirajang, kemudian dikering anginkan selama dua minggu dan pengeringan dilanjutkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga kadar airnya berkurang. Selanjutnya sampel kering ditimbang, berat yang diperoleh yaitu sebanyak 250 g, sampel sisik naga kering dihaluskan dengan

blender, kemudian diayak dengan ayakan mesh 200. Hasil ayakan disimpan dalam wadah plastik yang tertutup rapat.

### Ekstraksi dan Fraksinasi

Ekstraksi daun sisik naga dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol:air (4:1). Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi. Sebanyak 50 g simplisia kering dimasukkan kedalam wadah maserasi, ditambahkan pelarut metanol 200 ml:air 50 ml. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam. Sampel disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residunya, sehingga diperoleh filtrat metanol. Ekstraksi dilakukan pada residu yang telah diangin-anginkan sehingga terbebas dari metanol. Residu kemudian dimasukkan kedalam wadah dan diekstraksi dengan menambahkan etil asetat 200 ml. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam. Sampel disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residunya, filtrat etil asetat dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak etil asetat.

Fraksinasi dilakukan pada filtrat metanol. Filtrat metanol diasamkan dengan penambahan beberapa tetes asam sulfat hingga pH larutan 4, kemudian dimasukkan pada corong pisah. Selanjutnya dipartisi dengan menambahkan kloroform, setelah itu dikocok berulang kali sampai homogen. Didiamkan selama 24 jam sehingga terbentuk lapisan kloroform dan lapisan metanol-asam, masing-masing lapisan ditampung dalam wadah yang berbeda. Lapisan kloroform selanjutnya dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator*, sehingga diperoleh fraksi kloroform. Fraksinasi berikut dilakukan pada lapisan metanol-asam, lapisan metanol-asam ditambahkan beberapa tetes amoniak hingga pH larutan 10. Kemudian dimasukkan pada corong pisah, selanjutnya dipartisi dengan menambahkan kloroform-metanol dengan perbandingan 1:1, setelah itu dikocok

berulang kali sampai homogen. Didiamkan selama 24 jam sehingga terbentuk lapisan kloroform-metanol dan lapisan air-basa, masing-masing lapisan ditampung dalam wadah yang berbeda. Lapisan kloroform-metanol selanjutnya dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator*, sehingga diperoleh fraksi kloroform-metanol.

Fraksinasi berikut dilakukan pada lapisan air-basa, lapisan air-basa kemudian dimasukkan pada labu pisah, selanjutnya dipartisi dengan metanol sebanyak 200 ml, setelah itu dikocok berulang kali sampai homogen. Didiamkan selama 24 jam. Sehingga didapat filtrat metanol kemudian dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator*, sehingga diperoleh fraksi metanol.

### Penyiapan Larva *Artemia salina*

Penyiapan larva *Artemia salina* dilakukan dengan menetasakan telur *Artemia salina* 48 jam sebelum dilakukan uji. Penetasan dilakukan dengan cara merendam telur tersebut dalam air laut di dalam wadah yang diberi suplai oksigen dari aerator dan diberi penerangan dengan lampu 15 watt.

### Pelaksanaan Uji Toksisitas

Pelaksanaan uji toksisitas dilakukan dengan konsentrasi 0 ppm (kontrol), 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, dan 500 ppm. Setiap konsentrasi ekstrak sampel memerlukan 5 vial. Selanjutnya pada tiap konsentrasi dimasukkan larva *Artemia salina* yang telah berumur 48 jam, setiap tabung uji berisi 10 ekor larva *Artemia salina*. Volume akhir setiap tabung uji sebesar 10 mL. Tabung uji kemudian diletakkan di bawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva *Artemia salina* yang mati. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang ialah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik observasi.

**Isolasi Fraksi Paling Toksik Dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Isolasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT), eluen yang digunakan berupa campuran butanol-etil asetat-Aquades dengan perbandingan 4:1:5 (BEA) dan campuran butanol-asam asetat-aquades dengan perbandingan 4:1:5 (BAA), dijenuhkan dalam chamber. Lempeng silika yang digunakan diaktifkan di dalam oven pada suhu 100°C selama 60 menit. Ekstrak dilarutkan dengan 1 ml etanol 96%, ekstrak ditotolkan pada lempeng kromatografi. Pergerakan eluen diamati hingga mencapai batas atas, dikeringkan dengan hair dryer atau diangin-anginkan. Bercak yang terjadi diamati dengan menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm (Mohrig, 1979).

**Karakterisasi Gugus Fungsi Fraksi Paling Toksik Menggunakan FTIR**

Fraksi paling toksik yang telah diisolasi menggunakan KLT, kemudian dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan FTIR untuk mengetahui gugus fungsinya.

**Analisa Data**

Data hasil penelitian akan diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari uji toksisitas tersebut dianalisis dengan *regresi linear* menggunakan *Microsoft Excel 2010* untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub>.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil rendemen ekstrak dan fraksi daun epifit sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen Ekstrak dan Fraksi Daun Epifit Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl)

| No | Sampel | Berat Ekstrak dan Fraksi (g) | Rendemen % | Warna Ekstrak dan Fraksi |
|----|--------|------------------------------|------------|--------------------------|
| 1  | EEA    | 1,8                          | 3,60%      | Hijau pekat              |
| 2  | FK     | 2                            | 4,00%      | Hijau kecoklatan         |
| 3  | FKM    | 0,41                         | 0,82%      | Hijau bening             |
| 4  | FM     | 4,69                         | 9,30%      | Cokelat kehijauan        |

Keterangan :

EEA : Ekstrak etil asetat, FK : Fraksi kloroform, FKM : Fraksi kloroform-metanol, FM : Fraksi metanol

**Pelaksanaan Uji Toksisitas**

Pengujian pendahuluan diperoleh bahwa ekstrak etil asetat dan fraksi kloroform bersifat sangat toksik, sehingga konsentrasi ekstrak etil asetat dan fraksi kloroform dibuat lebih rendah (kecil). Konsentrasi yang digunakan yaitu 0 ppm

(kontrol), 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, dan 50 ppm, hal ini dimaksudkan agar mendapatkan hasil terbaik dibandingkan dengan konsentrasi awal. Hasil uji toksisitas ekstrak etil asetat, fraksi kloroform, kloroform-metanol dan metanol dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai LC<sub>50</sub> Ekstrak dan Fraksi Daun Epifit Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl)

| No | Sampel              | Regresi Linear     | R <sup>2</sup>         | LC <sub>50</sub> (ppm) |
|----|---------------------|--------------------|------------------------|------------------------|
| 1  | Etil asetat         | y = 1.325x + 16.50 | R <sup>2</sup> = 0.875 | 25,28 ppm              |
| 2  | Kloroform           | y = 1.592x + 24.98 | R <sup>2</sup> = 0.805 | 15,71 ppm              |
| 3  | Kloroform – Metanol | y = 0.104x + 7.116 | R <sup>2</sup> = 0.934 | 412,34 ppm             |
| 4  | Metanol             | y = 0.144x + 4.049 | R <sup>2</sup> = 0.941 | 319,10 ppm             |

Meyer, dkk, (1982) menyatakan bahwa senyawa uji dikatakan toksik jika harga  $LC_{50}$  lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Penentuan potensi bioaktif dilakukan dengan membandingkan nilai  $LC_{50}$  masing-masing ekstrak menurut McLaughin (1991). Menurut McLaughin (1991), nilai  $LC_{50} < 30$  ppm ekstrak berpotensi sebagai anti kanker (sitotoksik),  $LC_{50}$  30-200 ppm ekstrak berpotensi sebagai anti mikroba dan  $LC_{50}$  200-1000 ppm ekstrak berpotensi sebagai pestisida.

Berdasarkan data pada Tabel 2 di atas, Ekstrak etil asetat dan fraksi kloroform berpotensi sebagai anti kanker, sedangkan untuk fraksi kloroform-metanol dan fraksi metanol berpotensi sebagai pestisida. Fraksi kloroform memiliki nilai  $LC_{50}$  yang lebih kecil jika dibandingkan dengan Ekstrak etil asetat, yang mengindikasikan bahwa senyawa paling toksik pada fraksi daun sisik naga ialah fraksi kloroform.

Menurut Harbone (1982) fraksi paling toksik daun sisik naga mengandung terpenoid dan fenolik, diduga senyawa inilah yang terlarut pada pelarut. Menurut Haumahu, (2011) mekanisme kematian larva berhubungan dengan senyawa yang terlarut pada pelarut yang dapat menghambat daya makan larva. Cara kerja senyawa tersebut ialah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini

mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan.

### Isolasi Fraksi Paling Toksik Dengan KLT

Sistem eluen BEA menunjukkan pemisahan yang paling baik, sehingga digunakan sebagai eluen pada KLT. Eluen BEA memiliki pola pemisahan yang paling baik daripada eluen lain karena memberikan noda terbanyak dan terpisah baik serta jarak antar noda cukup terpisah. Ini juga dapat ditinjau pada metode Harbone (1987), yang menuliskan bahwa eluen yang baik ialah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda. Noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas.

Isolasi Fraksi paling toksik menggunakan metode KLT. KLT dibuat dengan menggunakan silika gel GF<sub>254</sub> sehingga dapat berfluoresensi di bawah lampu UV. Pada plat KLT, Fraksi paling toksik yang akan dipisahkan ditotolkan berupa garis pada salah satu sisi plat lapisan dan dikembangkan secara tegak lurus pada garis cuplikan sehingga campuran akan terpisah menjadi beberapa pita (Gritter dkk, 1991). KLT fraksi paling toksik setelah proses elusi selesai terlihat dibawah lampu UV paling sedikit terdapat tujuh noda, nilai Rf hasil isolasi fraksi paling toksik dapat dilihat pada Tabel 3.

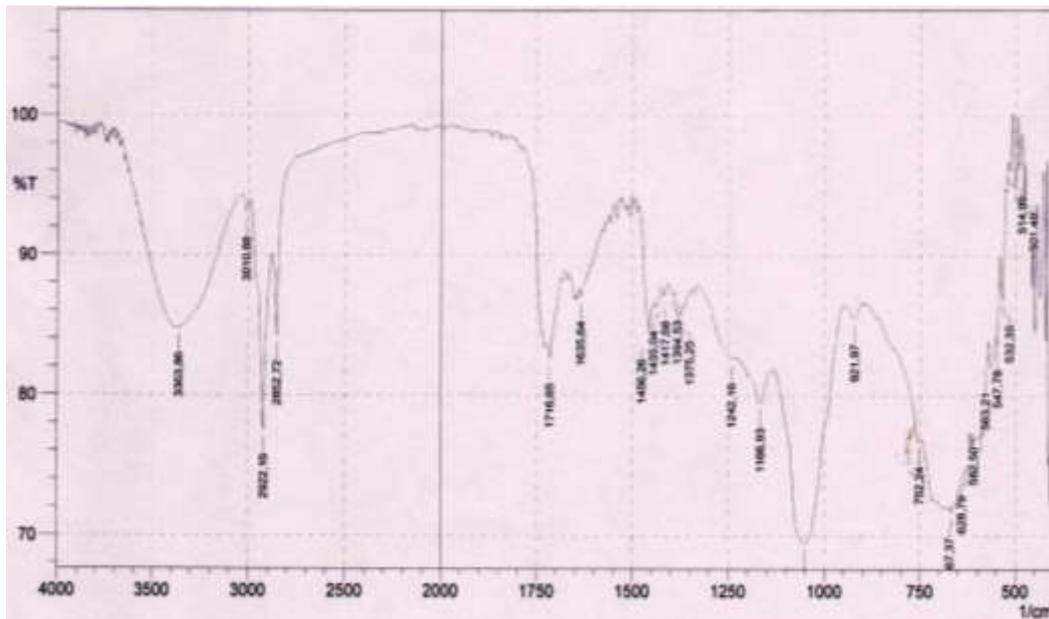
Tabel 3. Nilai Rf Hasil Isolasi Fraksi Paling Toksik Dengan KLT

| Noda | Nilai Rf | Warna noda setelah disinari dengan lampu UV 365 nm |
|------|----------|--|
| A    | 0,64     | Jingga   |
| B    | 0,59     | Merah muda   |
| C    | 0,55     | Kuning muda  |
| D    | 0,52     | Ungu   |
| E    | 0,50     | Hijau muda   |
| F    | 0,47     | Jingga muda  |
| G    | 0,16     | Hijau muda   |

**Identifikasi Senyawa Fraksi Paling Toksik Dengan FTIR**

Spektro Inframerah untuk senyawa fraksi paling toksik

memperlihatkan adanya serapan-serapan yang khas untuk beberapa gugus fungsi, dapat dilihat pada gambar 4 dan Tabel 4.



Gambar 4. Spektrum IR Fraksi Paling Toksik Daun Epifit Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl)

Tabel 4. Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa dalam Fraksi Paling Toksik Daun Epifit Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl)

| Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> ) | Literatur frekuensi (cm <sup>-1</sup> ) | Gugus | Jenis Senyawa                                   |
|--|---|-------|---|
| 3363 cm <sup>-1</sup>                  | 3300-3500 cm <sup>-1</sup>              | N-H   | Amina, amida                                    |
|  | 3200-3600 cm <sup>-1</sup>              | O-H   | Fenol, monomer alkohol, alkohol ikatan hydrogen |
| 2922 cm <sup>-1</sup>                  | 2850-2970 cm <sup>-1</sup>              | C-H   | Alkana  |
| 1716 cm <sup>-1</sup>                  | 1690-1760 cm <sup>-1</sup>              | C=O   | Aldehida, keton, asam karboksilat, Ester        |
| 1166 cm <sup>-1</sup>                  | 1050-1300 cm <sup>-1</sup>              | C-O   | Alkohol, eter, asam karboksilat, ester          |
| 752 cm <sup>-1</sup>                   | 675-995 cm <sup>-1</sup>                | C-H   | Alkena  |

Berdasarkan Tabel 4 diatas, data spektro inframerah senyawa fraksi paling toksik diduga mengandung gugus N-H dengan intensitas sedang dan O-H dengan intensitas kuat pada serapan yang melebar dengan bilangan gelombang 3363 cm<sup>-1</sup>, terdapat gugus C-H dengan intensitas kuat

pada serapan bilangan gelombang 2922 cm<sup>-1</sup> dan didukung dengan pita serapan 2852 cm<sup>-1</sup>, terdapat gugus C=O dengan intensitas kuat pada serapan bilangan gelombang 1716 cm<sup>-1</sup>, adanya gugus C-O dengan intensitas kuat pada serapan bilangan gelombang 1166 cm<sup>-1</sup> dan

didukung dengan pita serapan  $1050\text{ cm}^{-1}$ , adanya gugus C-H dengan intensitas kuat pada serapan bilangan gelombang  $752\text{ cm}^{-1}$ , diduga fraksi ini memiliki gugus fungsi utama amina dan amida (N-H), fenol, monomer alkohol, alkohol ikatan hydrogen (O-H), alkana dan alkena (C-H), aldehida, keton, asam karboksilat dan ester (C=O), alkohol, eter, asam karboksilat dan ester (C-O). hal ini sesuai dengan data tabel identifikasi menurut Settle, (1997) dan Skoog, dkk (1998).

## PENUTUP

### Kesimpulan

1. Ekstrak etil asetat dan fraksi kloroform berpotensi sebagai anti kanker, sedangkan fraksi kloroform-metanol dan fraksi metanol berpotensi sebagai pestisida.
2. Karakteristik gugus fungsi yang terlihat pada fraksi paling toksik diduga memiliki gugus fungsi utama amina dan amida (N-H), fenol, monomer alkohol, alkohol ikatan hidrogen (O-H), alkana dan alkena (C-H), aldehida, keton, asam karboksilat dan ester (C=O), alkohol, eter, asam karboksilat dan ester (C-O).

### Saran

Pada penelitian ini fraksi kloroform terbukti fraksi paling toksik yang berpotensi sebagai anti kanker. Berdasarkan hasil ini perlu adanya penelitian yang lebih lanjut tentang fraksi kloroform daun epifit sisik naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl) terhadap sel kanker.

## DAFTAR PUSTAKA

Gritter., Roy J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: Penerbit ITB.

- Harbone, J. B. 1987. *Metode fitokimia. Edisi ke-dua*. ITB, Bandung.
- Malinda, A. F., Fatimawali, Adithya, Y. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Paku Sisik Naga (*Drymoglossum piloselloides* (L) Presl) Terhadap Peroksidasi Lipid Hati Pada Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi CC14. *Pharmacon*, Vol. 2 : 72-75
- McLaughlin JL. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disks a Brine Shrimp Lethality, Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractination. In: K.Hostettman (ed), *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 6, Assay for Bioactivity, *Academic Press*, 1991: 1-32.
- Meyer, B. N. Ferrigni, Putnam, J. E. Jacobsen, L. B. Nichols., McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica* 45: 31-34.
- Mohrig., Neckers. 1979. *Laboratory Experiments in Organic Chemistry*. Third Edition. D. Van Nostrand Company New York.
- Settle, F. 1997. *Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Prentice-Hall, Inc. Upper Sadle River. New Jersey
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. 1998. *Principles Of Instrumental Analysis, 5th Edition*. Saunders College Publishing. Philadelphia
- Smith, G. M. 1979. *Cryptogamic Botany Vol. II Bryophyte and Pteridophyte*. Mc.Graw-Hill Book Company Inc. New York. P 214-222