

## UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA DAN TOKSISITAS DENGAN METODE BSLT SERTA PENAPISAN FITOKIMIA EKSTRAK DAUN ALAMANDA (*Allamanda cathartica* L.)

### Antimicrobial Activity Test and Toxicity by BSLT Method and Phytochemical Screening of Alamanda (*Allamanda cathartica* L.) Leaves

Kusmiati<sup>1</sup>, Erlindha Gangga<sup>2</sup>, Evi Irmawati<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI Jl Raya Bogor Km 46, Cibinong Bogor 16911

<sup>2,3</sup> Fakultas Farmasi-Universitas Pancasila, Jl. Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta

E-mail : Kusmiati02@yahoo.com

**Abstract-** Alamanda (*Allamanda cathartica* L.) leaves has an antioxidant and toxicity potential. Leaves extracted by maceration with ethanol, and partitioned with petroleum ether, ethyl acetate, methanol and chloroform. The extract was tested the antimicrobial activity using agar diffusion method and its toxicity test by Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. Phytochemical screening of the extract condensed done to determine the content of secondary metabolites. The Antimicrobial activity test showed that the phase of petroleum ether, ethyl acetate, chloroform and methanol alamanda leaves potentially inhibit *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The highest antimicrobial activity was observed for the phase petroleum ether of alamanda which inhibited zone 10.45 mm against *Saccharomyces cerevisiae*. Whereas the phase ethyl acetate, chloroform and methanol phase of alamanda showed the largest inhibition zone respectively 7.33 mm, 8.59 mm and 7.02 mm against *Candida albicans*. The toxicity tests of alamanda leaf extracts against larvae shrimp (*Artemia salina* Leach) showed that the petroleum ether phase has LC50 values of 64.13 ppm was toxic, the ethyl acetate phase at 26.55 ppm was highly toxic, the chloroform phase at 23.39 ppm was highly toxic and methanol extracts of 38.19 ppm were toxic. Phytochemical screening of the leaf powder and methanol phase of alamanda contained alkaloids, flavonoids, saponins, tannins and steroids / triterpenoids. Petroleum ether phase contained steroids / triterpenoids, whereas the ethyl acetate phase contained alkaloids, saponins, tannins and steroids, and the chloroform phase containing alkaloids, flavonoids, saponins and steroids / triterpenoids.

**Keywords:** *Allamanda cathartica* Leaves, antimicrobial, toxicity, BSLT

#### PENDAHULUAN

Salah satu tanaman yang mempunyai potensi sebagai antimikroba adalah tanaman alamanda. *Allamanda cathartica* merupakan tanaman hias yang secara empiris digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit, yang dalam dosis kecil memiliki khasiat sebagai obat penangkal keracunan, antimuntah, dan cuci perut. Senyawa yang berkhasiat sebagai antimikroba dari daun alamanda adalah Plumerisin. Plumerisin memiliki aktivitas antijamur dan antibakteri dengan spektrum kerja yang luas terhadap mikroorganisme secara *in vitro* [1]. Selain itu peranan metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Gusnir Muthia disebutkan bahwa ekstrak etanol, etil asetat, petroleum eter, kloroform, dan metanol daun Alamanda (*Allamanda cathartica* L.) mempunyai

aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa* [2]. Pada penelitian ini menguji potensi antimikroba terhadap *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

Ekstraksi serbuk daun alamanda kering dengan etanol 96%, dilakukan menggunakan metode Kupchan *et al* (1974), maserat diuapkan dengan rotavapor dan dipartisi dengan pelarut etil asetat, petroleum eter, metanol, dan kloroform [3]. Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap ekstrak kental petroleum eter, etil asetat, kloroform, dan metanol.

Selanjutnya dilakukan uji aktivitas biologi secara BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dari ekstrak daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.). BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) merupakan metode untuk mengetahui

bioaktivitas senyawa yang terdapat dalam bahan alam dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach. Sifat toksisitas diketahui berdasarkan jumlah kematian larva udang. Menurut Meyer dkk (1982), suatu ekstrak dikatakan memiliki toksisitas apabila memiliki  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ . Metode ini sering digunakan untuk penelitian awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tanaman, karena mudah dilakukan, sederhana, cepat, dan murah [4].

## METODE PENELITIAN

### 1. Pembuatan ekstrak kental daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.)

Sejumlah 100 gram serbuk kering daun tanaman alamanda (*Allamanda cathartica* L.) diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan dipartisi menggunakan kloroform jenuh air (2:1,5), etil asetat–air (1:1), selanjutnya Fase kloroform dipartisi dengan metanol 10% dan petroleum eter (1:1). Fase metanol dipartisi menggunakan metanol 40%:kloroform (1:2). Semua fase uji dipisahkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak kental.

### 2. Penapisan fitokimia

Identifikasi kandungan metabolit sekunder daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.) dilakukan terhadap daun segar dan ekstrak kental dari fase petroleum eter, etil asetat, kloroform dan metanol menggunakan metode Franswort meliputi [5] :Identifikasi golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, kuinon, steroid dan triterpenoid, kumarin, dan minyak atsiri.

### 3. Uji aktivitas antimikroba dengan metode difusi agar[6]

Uji aktivitas senyawa antibakteri dilakukan secara aseptik dalam media agar dua lapis steril dengan komposisi lapisan bawah: ekstrak ragi 0,3%, pepton 0,5% dan agar 1,5%, Lapisan atas media lunak dengan komposisi sama mengandung agar 0,75%. Sebanyak 8 mL media lunak yang telah

disterilkan dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  tekanan 1 atmosfer selama 15 menit ditambahkan  $8 \mu\text{L}$  bakteri uji yaitu bakteri *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae* dengan kekeruhannya 25%. Suspensi sel dikocok homogen lalu dituangkan di atas media dan didiamkan hingga padat. Kertas cakram steril diletakkan dipermukaan agar, ditetesi dengan  $20 \mu\text{L}$  masing-masing ekstrak kental daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.). Kontrol positif menggunakan antibiotik kloramfenikol. Kultur *Bacillus subtilis* dan *Micrococcus luteus* diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam, dan *Candida albicans* dan *Saccharomyces cerevisiae* pada suhu  $20-25^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekeliling kertas cakram diukur diameternya.

### 4. Uji toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)[7]

Pengujian BSLT dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach dilakukan terhadap fase petroleum eter, etil asetat, kloroform, dan metanol daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.) dengan konsentrasi 10, 100, 1000  $\mu\text{g/mL}$  dalam vial. Ke dalam masing-masing vial di tambahkan kurang lebih 3 mL air laut sintetik 3,8% dan dimasukkan 10 ekor nauplii udang laut berumur 2 hari, kemudian diencerkan hingga volume 5 mL. Larutan uji di diamkan selama 24 jam di bawah sinar lampu. Rumus perhitungan nilai mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach (%) sebagai berikut :

$$\% \text{ mortalitas teramati} = \frac{\text{Jumlah larva udang yang mati}}{\text{Jumlah larva udang yang hidup}} \times 100 \%$$

Di buat grafik antara log konsentrasi terhadap mortalitas. Nilai  $LC_{50}$  di peroleh dengan cara menarik garis pada nilai 50% dari sumbu mortalitas sampai memotong sumbu grafik, perpotongan garis di tarik ke garis konsentrasi di mana zat menyebabkan kematian 50% larva yang disebut  $LC_{50}$ . Suatu zat di katakan aktif atau toksik bila nilai  $LC_{50} <$



1000 µg/mL, sedangkan dapat bersifat antikanker bila nilai  $LC_{50} \leq 30$  µg/mL [4].

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### 1. Ekstraksi dan partisi daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.)

Sejumlah lebih kurang 100 gram serbuk kering daun tanaman alamanda (*Allamanda cathartica* L.) di maserasi berulang menggunakan pelarut etanol 96%. Maserat dipekatkan dengan rotavapor menghasilkan ekstrak kental etanol 76,8 gram, diperoleh rendemen sebesar 76,8%. Etanol digunakan

karena merupakan pelarut bersifat universal dan dapat mengekstraksi semua senyawa metabolit. Partisi menggunakan kloroform jenuh air (2:1,5) terbentuk fase air dan fase kloroform, dipekatkan keduanya. Fase air dipartisi dengan etil asetat-air (1:1) lalu pekatkan. Fase kloroform dipartisi dengan metanol 10%- petroleum eter didapat fase metanol dan fase petroleum eter. Fase metanol dipekatkan lalu dipartisi lagi menggunakan metanol 40% - kloroform (1:2). Hasil ekstrakt dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil partisi ekstrak daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.) dengan berbagai pelarut.

Sampel	Berat (gram)	Rendemen (%) <sup>*</sup>
Fase Petroleum eter	25,8	25,8
Fase Etil asetat	5,4	5,4
Fase Kloroform	0,9	0,9
Fase Metanol	33,4	33,4

\*berat kering 100 g serbuk simplisia

Proses ekstraksi mengikuti cara kerja Kupchan *et al* (1974). Dilakukan partisi menggunakan pelarut petroleum eter, etil asetat, kloroform dan metanol [3]. Hal ini untuk melihat kemampuan masing-masing pelarut dalam menarik senyawa bioaktif, dan menentukan pelarut yang baik dalam mengekstraksi senyawa dari daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.).

Rendemen terbesar diperoleh ekstrak dengan pelarut metanol, hal ini di karenakan metanol merupakan pelarut organik yang bersifat universal, yaitu melarutkan senyawa yang bersifat nonpolar sampai bersifat polar

dalam bentuk ikatan glikosida, sehingga banyak senyawa yang dapat ditarik dari daun alamanda.

### 2. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap serbuk kering dan ekstrak kental dari fase petroleum eter, etil asetat, kloroform dan metanol daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.) untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Hasil dapat dilihat pada tabel 2 berikut:

Tabel 2. Hasil penapisan fitokimia serbuk kering dan ekstrak kental hasil partisi dari serbuk kering daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.).

Golongan senyawa	Serbuk kering	Ekstrak petroleum eter	Ekstrak Etil asetat	Ekstrak kloroform	Ekstrak methanol
Alkaloid	+	-	+	+	+
Flavonoid	+	-	-	+	+
Saponin	+	-	+	+	+
Tanin	+	-	+	-	+
-Tanin katekuat	-	-	-	-	-
-Tanin galat	+	-	+	-	+
Kuinon	-	-	-	-	-
Steroiddan triterpenoid	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Minyak atsiri	-	-	-	-	-
Kumarin	-	-	-	-	-

\*Keterangan : (+) = memberikan hasil positif (-) = memberikan hasil negatif

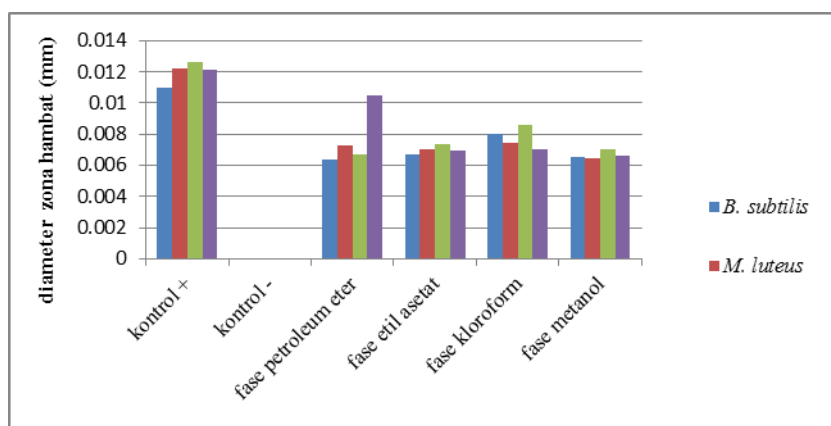


Sebagai perbandingan hasil peneliti lain melaporkan bahwa hasil uji fitokimia ekstrak daun alamanda teridentifikasi mengandung alkaloid, senyawa phenolik, flavonoid, saponin, glycosida, terpenoid, steroid, kumarin, kuinon, phytosterol, protein dan karbohidrat. Ada tidaknya kandungan senyawa-senyawa tersebut tergantung pada pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dan sifat fisiologi bunga [8]

### 3. Uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat, petroleum eter, metanol, dan kloroform daun alamanda.

Uji aktivitas antimikroba ekstrak kental daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.) dilakukan

dengan metode difusi agar menggunakan kertas cakram dengan mengamati zona jernih yang terbentuk. Pengujian dilakukan pada setiap ekstrak (petroleum eter, etil asetat, kloroform dan metanol). Mikroba uji yang digunakan yaitu Bakteri Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*), jamur *Candida albicans* dan ragi *Saccharomyces cerevisiae*. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak kental daun alamanda (*A. cathartica* L.) dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1. Histogram hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak daun alamanda

Berdasarkan histogram diatas, hasil uji antimikroba ekstrak kental dari fase petroleum eter, etil asetat, kloroform, dan metanol pada daun alamanda (*A. cathartica* L.) terlihat bahwa semua ekstrak dengan pelarut berbeda mempunyai sifat daya antimikroba, hal ini ditandai dengan adanya zona hambat pada mikroba *B. subtilis*, *M. luteus*, *C. albicans* dan *S. cerevisiae* disekitar kertas cakram. Fase petroleum eter daun alamanda memberikan aktivitas tertinggi terhadap *S. cerevisiae* dengan zona hambat rata-rata sebesar 10,45 mm. Fase etil asetat memberikan zona hambat terhadap *C. albicans* dan *S. cerevisiae*, berturut-turut rata-rata 7,33 mm dan 6,98 mm. Fase

kloroform daun alamanda memberikan zona hambat terbesar terhadap *B. subtilis*, *M. luteus*, *C. albicans* dan *S. cerevisiae*, berturut-turut: 8,0mm, 7,45mm, 8,59mm dan 6,99mm. Sedangkan Fase metanol daun alamanda membentuk zona hambat tertinggi terhadap *C. Albicans* sebesar 7,02mm.

Pelarut petroleum eter, etil asetat, kloroform dan metanol diuji aktivitas antimikroba sebagai kontrol negatif, hasil tidak ada hambatan terhadap mikroba uji hal ini menunjukkan bahwa zona hambat pada uji ekstrak bukan berasal dari pelarut yang digunakan. Pengujian kontrol positif menggunakan kloramfenikol bertujuan untuk melihat kepekaan mikroba uji terhadap



antibiotik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kloramfenikol dapat menghambat pertumbuhan mikroba uji. Diameter zona jernih rata-rata berturut-turut *B. subtilis* (10,99mm), *M. Luteus* (12,26mm), *C. Albicans* (12,60mm) dan *S. Cerevisiae* (12,15mm).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak kloroform daun alamanda memiliki aktivitas antimikroba terhadap Bakteri Gram positif (*B. subtilis*, *M. luteus*), jamur *C. albicans* dan ragi *S. cerevisiae*. Berdasarkan hasil penapisan fitokimia bahwa ekstrak kloroform mengandung metabolit sekunder terdiri dari senyawa terlarut alkaloid, flavonoid, steroid dan triterpenoid. Senyawa

alkaloid dan flavonoid memiliki mekanisme kerja merusak dan mengganggu dinding sel sehingga membuat sel bakteri lisis dan mati [9]. Senyawa steroid dapat meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga akan terjadi kebocoran sel yang diikuti dengan keluarnya materi intraseluler [10]. Senyawa triterpenoid memiliki mekanisme kerja mengdisrupsi membran sel sehingga mengakibatkan gangguan permeabilitas sel yang menghambat nutrisi masuk kedalam sel bakteri. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak kental daun alamanda (*A. cathartica* L.) dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak kental petroleum eter daun alamanda (*A. cathartica* L.)

Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Ekstrak kental 20 µl	6,56	7,95	6,85	11,15
1000 µl : 1000 µl	6,35	7,45	6,55	9,75
500 µl : 1000 µl	6,29	6,95	-	-
Rata-rata	6,4	7,25	6,7	10,45
Kontrol (+) kloramfenikol	11,65	11,85	16,55	11,75
Kontrol (-) petr eter	-	-	-	-

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak kental etil asetat daun alamanda (*A. cathartica* L.)

Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Ekstrak kental 20 µl	7,14	7,75	7,95	7,95
1000 µl : 1000 µl	6,95	7,75	7,35	6,35
500 µl : 1000 µl	6,45	6,55	7,25	6,64
Rata-rata	6,67	7,08	7,33	6,98
Kontrol (+) kloramfenikol	9,55	11,45	6,85	11,85
Kontrol (-) etil asetat	-	-	-	-

Tabel 5. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak kental kloroform daun alamanda (*A. cathartica* L.)

Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Ekstrak kental 20 µl	8,55	8,85	9,55	7,94
1000 µl : 1000 µl	8,25	7,95	8,75	6,75
500 µl : 1000 µl	7,75	6,65	8,74	6,65
Rata-rata	8,00	7,45	8,59	6,99
Kontrol (+) kloramfenikol	11,44	12,95	11,75	11,65
Kontrol (-) kloroform	-	-	-	-



Tabel 6. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak kental metanol daun alamanda (*A. cathartica* L.)

Konsentrasi	Diameter zona hambat (mm)			
	<i>B.subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Ekstrak kental 20 µl	6,95	6,65	7,64	6,64
1000 µl : 1000 µl	6,64	6,45	7,25	6,55
500 µl : 1000 µl	6,45	6,34	6,65	-
Rata-rata	6,573	6,425	7,02	6,595
Kontrol (+) kloramfenikol	11,35	12,79	15,25	13,34
Kontrol (-) metanol	-	-	-	-

#### 4. Uji Toksisitas dengan metode BSLT

Uji toksisitas dilakukan terhadap fase petroleum eter, etil asetat, kloroform dan metanol daun alamanda menggunakan larva udang *Artemia Salina Leach* dengan metode BSLT.

Hasil uji dapat dilihat dari nilai LC<sub>50</sub> (µg/ml) pada Tabel 7:

Tabel 7. Hasil uji toksisitas secara BSLT

Fase	Nilai LC <sub>50</sub> (bpj)
Petroleum eter	64,13
Etil asetat	26,55
Kloroform	23,39
Metanol	38,19

Ekstrak kloroform daun alamanda menunjukkan aktivitas biologi yang paling tinggi, dilihat dari nilai LC<sub>50</sub> yang paling rendah, hal ini dapat disebabkan kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak kloroform daun alamanda lebih banyak yaitu golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin galat, steroid dan triterpenoid. Sedangkan ekstrak petroleum eter menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> yang paling besar, hal ini diduga berkaitan dengan kandungan senyawa yaitu hanya mengandung golongan senyawa alkaloid, saponin, steroid dan triterpenoid. Suatu larutan ekstrak dikatakan sangat toksik apabila nilai LC<sub>50</sub> ≤ 30 µg/mL, toksik apabila nilai LC<sub>50</sub> 30 µg/mL-1000 µg/mL dan tidak toksik apabila nilai LC<sub>50</sub> > 1000 µg/mL [4]. Berdasarkan kriteria tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak petroleum eter dan ekstrak metanol bersifat toksik sedangkan ekstrak etil asetat dan kloroform

bersifat sangat toksik. Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT diperoleh bahwa kekuatan aktivitas biologi ekstrak daun alamanda sebagai berikut : nilai LC<sub>50</sub> ekstrak kloroform > ekstrak etil asetat > ekstrak metanol > ekstrak petroleum eter. Dengan demikian, ekstrak kloroform daun alamanda menunjukkan aktivitas biologi tertinggi dengan LC<sub>50</sub> 23,39 bpj µg/mL, hal inididuga dalam ekstrak tersebut mengandung senyawa dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak lainnya.

#### SIMPULAN, SARAN DAN REKOMENDASI

##### Simpulan

1. Hasil penapisan fitokimia serbuk dan ekstrak daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.) mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin galat, steroid dan triterpenoid.
2. Hasil pengujian aktivitas antimikroba menunjukkan fase petroleum eter daun alamanda (*A.cathartica* L.) memiliki zona hambat paling besar(10,45mm) terhadap *Saccharomyces crevisiae*, diikuti fase etil asetat, fase kloroform dan fase methanol berturut-turut sebesar 7,33 mm, 8,59 mm dan 7,02 mm terhadap *Candida albicans*.
3. Hasil uji aktivitas biologi daun alamanda (*A.cathartica* L.) terhadap larva udang *Artemia Salina Leach* dengan metode BSLT menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> masing-masing : fase petroleum eter LC<sub>50</sub> 64,13 bpj (toksik), fase etil asetat LC<sub>50</sub> 26,55 bpj (sangat toksik), fase kloroform LC<sub>50</sub> 23,39



bpj (sangat toksik) dan fase metanol LC<sub>50</sub>38,19 bpj (toksik).

#### Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam daun alamanda (*Allamanda cathartica* L.) berkaitan dengan potensinya terhadap penghambatan ragi dan khamir. Demikian juga analisa lebih lanjut terhadap fase etil asetat dan fase kloroform daun alamanda berkaitan sifatnya yang sangat toksik hasil uji aktifitas biologi terhadap *Artemia Salina Leach*.

#### Rekomendasi

Penggunaan ekstrak etil asetat daun alamanda lebih aman dan memiliki aktifitas biologi tinggi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- <sup>1</sup>Van Valkenburg, J.L.C.H. &N.Bunyapraphatsara, N. 2002. PROSEA (Plant Resources of South-East Asia) Medicinal and poisonous plants 2. No 12(2). Prosea Foundation, Bogor, Indonesia. h. 49-51
- <sup>2</sup>Gusnir M, 2012.Isolasi dan identifikasi senyawa aktif antibakteri dari ekstrak daun alamanda dengan metode kromatografi gas spektrofotometri massa(skripsi).Fakultas farmasi universitas pancasila.Jakarta
- <sup>3</sup>Kupchan,S .M., A.L. Dessertine. B.T. Blaylock &R.F.Bryan. 1974. Isolation and Struktural Elucidation of Allamandin an Antileukemic Iridoid lactone from *Allamanda cathartica*.Journal of Organic Chemistry. 39(17): 2477-2482.
- <sup>4</sup>Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE,McLaughlin JL. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassayfor active plant constituents. *Plant med* 45:31-34
- <sup>5</sup>Fransworth NR. 1996. Biological and Phytochemical Screenings of Plants. J Pharm Sci;.h.25-65.
- <sup>6</sup>Nithya K. and J. Muthumary. 2011. Bioactive Metabolite Produced By *Phomopsis Sp.*, An Endophytic Fungus, In *Allamanda Cathartica* Linn. Recent Research In Science And Technology, 3(3): 44-48
- <sup>7</sup>Emelia Kisseih. 2008. Antimicrobial And Wound Healing Activities Of *Clerodendron Splendens* G. Don. (Thesis) Faculty Of

Pharmacy And Pharmaceutical Sciences College Of Health Sciences Kumasi, Ghana

- <sup>8</sup>Joseph Joselin, T. S. Shynin Brintha, A. R. Florence, S. Jeeva. 2012. Screening of select ornamental flowers of the family Apocynaceae for phytochemical constituents. Asian Pacific Journal of Tropical Disease: S260-S264
- <sup>9</sup>Cowan MM, 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev.;12(4):h. 564-582.
- <sup>10</sup>Vickery ML, Vickery B. 1981.*Secondary Plant Methabolism*. London: The Macmillan Press.

