

MUCOLYTIC IN VITRO ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Hibiscus rosa-sinensis* L. RED STRAIGHT CROWN

AKTIVITAS MUKOLITIK SIRUP EKSTRAK ETANOLIK BUNGA KEMBANG SEPATU (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) WARNA MERAH MAHKOTA TEGAK SECARA *IN VITRO*

Dinar Hesti Permatasari, Mimiek Murrukmihadi*

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Skip Utara 55291, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Ethanol extract of red shoe flower (Hibiscus rosa-sinensis L.) has been known to decrease mucus viscosity by in vitro. The aim of this study is to evaluate the effect of various concentration of the extract in syrup for decreasing mucus viscosity and to evaluate the extract concentration which is equal with asetilsistein syrup 2.00%. Ethanol extract was produced by maseration and made into five different concentration of syrup formula (1.00; 1.25; 1.50; 1.75 and 2.00%). The result showed that there is not any mucolytic activity from all of the formulas by decreasing mucus viscosity and there is not any formula as effective as mucolytic activity of asetilsistein 2.00%.

Keywords : mucolytic, syrup, ethanol extract, red shoe flower.

ABSTRAK

Ekstrak etanolik bunga kembang sepatu warna merah telah terbukti dapat menurunkan viskositas mukus secara in vitro. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui besarnya pengaruh varian konsentrasi ekstrak dalam menurunkan viskositas mukus dalam sirup secara in vitro dan untuk mengetahui besarnya konsentrasi ekstrak yang sebanding dengan sirup asetilsistein 2,00%. Ekstrak etanolik diperoleh dengan menggunakan metode maserasi kemudian dibuat dalam sediaan sirup dengan konsentrasi ekstrak yang bervariasi (1,00; 1,25; 1,50; 1,75 dan 2,00%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sirup dengan konsentrasi ekstrak 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; dan 2,00% tidak menunjukkan adanya aktivitas mukolitik secara in vitro dengan menurunkan viskositas mukus usus sapi dan tidak ada yang sebanding dengan aktivitas mukolitik asetilsistein 2,00%.

Kata kunci : mukolitik, sirup, ekstrak etanolik, kembang sepatu.

PENDAHULUAN

Bunga kembang sepatu merah merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat batuk (Heyne, 1950) dengan cara meluruhkan dahak (Anonim, 1985). Penelitian yang dilakukan oleh Lande (2009) telah dapat membuktikan secara ilmiah ekstrak etanolik bunga kembang sepatu merah dengan kadar 1,25% dan 1,50% mampu menurunkan viskositas mukus sapi secara *in vitro*. Pada penelitian yang dilakukan oleh Hidayati (2010) telah mengoptimasi formula sirup fraksi alkaloid kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) warna merah.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui besarnya kadar atau konsentrasi ekstrak etanolik kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) warna merah dengan mahkota tegak dalam formulasi sirup optimum yang mempunyai viskositas

mukolitik dan pada konsentrasi yang sebanding dengan sirup asetilsistein 2,00% dalam menurunkan viskositas mukus sapi secara *in vitro*.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan adalah bunga kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L) warna merah dengan mahkota tegak yang diperoleh dari daerah kabupaten Sleman, Yogyakarta. Bahan yang digunakan untuk membuat ekstrak etanolik adalah etanol 70% (teknis). Bahan yang digunakan untuk membuat formulasi sirup adalah ekstrak etanolik bunga kembang sepatu merah mahkota tegak, larutan sorbitol 70%, gliserin, CMC-Na, asam tartrat, natrium benzoat, perasa strawbery, dan air suling. Bahan yang digunakan untuk uji mukolitik adalah sirup ekstrak etanolik bunga kembang sepatu warna merah, mukus usus sapi dewasa, dapar fosfat pH 7 yang terbuat dari natrium hidroksida dan kalium dihidrogenfosfat,

Corresponding author: Mimiek Murrukmihadi
E-mail: motfarmasiugm@gmail.com

Tabel I. Sirup ekstrak etanolik bunga kembang sepatu dengan variasi konsentrasi ekstrak

Bahan	Formula sirup					
	I	II	III	IV	V	VI
Ekstrak (% b/v)	-	0,577	0,721	0,857	1,009	1,154
Asetilsistein (g)	-	-	-	-	-	-
Gliserin (g)	14,49	14,49	14,49	14,49	14,49	14,49
Lar. sorbitol 70% (g)	16,75	16,75	16,75	16,75	16,75	16,75
CMC-Na 0,5% (g)	8,36	8,36	8,36	8,36	8,36	8,36
Na benzoat (g)	0,144	0,144	0,144	0,144	0,144	0,144
Asam tartrat (g)	0,204	0,204	0,204	0,204	0,204	0,204
Perasa (g)	0,0204	0,0204	0,0204	0,0204	0,0204	0,0204
Air suling (mL) ad	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00

Keterangan :

- Formula sirup I : tanpa ekstrak (kontrol negatif)
 Formula sirup II (1,00%) : ekstrak etanolik bunga kembang sepatu 0,577g
 Formula sirup III (1,25%) : ekstrak etanolik bunga kembang sepatu 0,721g
 Formula sirup IV (1,50%) : ekstrak etanolik bunga kembang sepatu 0,857g
 Formula sirup V (1,75%) : ekstrak etanolik bunga kembang sepatu 1,009g
 Formula sirup VI (2,00%) : ekstrak etanolik bunga kembang sepatu 1,154g

serta air suling bebas CO₂ dan asetilsistein sebagai kontrol positif. Alat yang digunakan adalah oven (Memmert), alat-alat gelas, neraca analitik, dan viskosimeter Ostwald.

Jalannya penelitian

Pembuatan ekstrak

Bunga kembang sepatu dipetik pada pukul 08.00-10.00, dicuci, diangin-anginkan, lalu ditimbang dan dikeringkan dalam oven selama ± 24 jam dengan suhu 50°C, lalu diserbuk dan ditimbang. Serbuk bunga sepatu dimaserasi dengan perbandingan 1:10 antara serbuk dan larutan penyari etanol 70%.

Identifikasi alkaloid

Identifikasi senyawa alkaloid dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Ekstrak kental yang diperoleh diencerkan dengan sedikit etanol 70% dan kemudian ditotolkan pada silika gel 60 F₂₅₄ dan dielusi menggunakan fase gerak etil asetat : metanol (1:5) (Fitria, 2009). Hasil dari elusi tersebut selajutnya dideteksi menggunakan sinar UV_{254nm} dan UV_{366nm} dan diidentifikasi menggunakan pereaksi Dragendroff.

Formula sirup

Formula sirup ekstrak etanolik kembang sepatu merah diperoleh berdasarkan formula sirup yang telah dioptimasi menggunakan *Design Expert*[®] (Anonim, 2009), Gliserin (14,49g), Natrium benzoat (0,144g), Perasa (0,0204g), Asam tartat (0,204g), Larutan sorbitol 70% (16,75g) CMC-Na (8,36g) Air suling/ad (60mL).

Pembuatan sirup

Formula sirup ekstrak etanolik kembang sepatu merah diperoleh berdasarkan formula sirup yang telah dioptimasi menggunakan *Design Expert*[®] (Anonim, 2009) dengan lima variasi formula sirup dengan kadar ekstrak 1,00%; 1,25%; 1,50%; 1,75%; dan 2,00%.

Pembuatan sirup ekstrak etanolik kembang sepatu merah diawali dengan menambahkan air ke dalam CMC-Na pada suhu 70°C sedikit demi sedikit dan diaduk hingga terbentuk musilago yang jernih. Dibiarkan dingin sampai mencapai suhu 25°C-30°C sambil diaduk pelan. Gliserin ditambahkan asam tartrat dan diaduk sampai homogen. Ekstrak dilarutkan dengan sedikit air suling kemudian ditambahkan pada campuran gliserin-asam tartrat dan diaduk sampai homogen, kemudian ditambahkan musilago CMC-Na, diikuti dengan penambahan sorbitol 70% sambil diaduk dengan pelan. Natrium benzoat dilarutkan dengan sedikit air pada suhu 25°C dan diaduk sampai menjadi larutan yang jernih kemudian ditambahkan ke dalam campuran di atas sambil diaduk pelan. Ditambahkan perasa dalam campuran larutan sambil diaduk pelan. Air suling ditambahkan hingga 60mL dan diaduk kuat, yang terakhir dilakukan pengecekan pH dan pemeriksaan organoleptis dari masing-masing sirup.

Uji aktivitas mukolitik

Usus sapi yang digunakan berasal dari usus sapi dewasa yang masih segar. Usus yang diperoleh dibersihkan dari kotoran menggunakan air mengalir. Mukus dikumpulkan dengan cara mengurut usus dan memotongnya membujur,

kemudian mengerok lapisan mukosa hingga bersih. Setelah mukus terkumpul, diaduk pelan hingga homogen.

Larutan dapar fosfat dibuat dengan mencampur 50mL kalium dihidrogenfosfat 0,2M dengan 29,1mL natrium hidroksida 0,2N dan diencerkan dengan air bebas karbondioksida P secukupnya hingga 200mL (Anonim, 1979). Dapar yang telah dibuat kemudian dicek pH menggunakan pH meter. Pembuatan larutan mukus 20% b/b dalam dapar fosfat dilakukan dengan cara mencampur mukus sebanyak 20 bagian (dalam bobot) dengan dapar-fosfat pH 7 sebanyak 80 bagian (dalam bobot) sehingga total 100 bagian (dalam bobot).

Sediaan kontrol negatif yang digunakan adalah larutan mukus-dapar fosfat 20% b/b yang ditambah sirup tanpa ekstrak dengan perbandingan 1:1 (dalam bobot). Sediaan kontrol negatif dibuat dengan mencampurkan sirup tanpa ekstrak sebanyak 7,5g dengan tween 80 sebanyak 0,5% b/b dari bobot total atau sebesar 0,15g. Kemudian ditambahkan larutan mukus-dapar fosfat hingga diperoleh bobot total sebesar 30g dan diaduk hingga campuran dapat homogen. Sediaan kontrol positif yang digunakan adalah sirup asetilsistein 2% yang dicampur dengan larutan mukus-dapar fosfat menggunakan perbandingan 1:1 (dalam bobot). Sediaan kontrol positif dibuat dengan mencampurkan sirup asetilsistein 2% sebanyak 15g dengan tween 80 sebanyak 0,5% b/b dari bobot total atau sebesar 0,15g. Kemudian ditambahkan larutan mukus-dapar fosfat hingga diperoleh bobot total sebesar 30g dan diaduk sampai didapatkan campuran yang homogen.

Sediaan uji yang digunakan adalah sirup ekstrak etanolik bunga kembang sepatu konsentrasi 1,00; 1,25, 1,50; 1,75 dan 2,00% yang masing-masing ditambah dengan larutan mukus-dapar fosfat dengan perbandingan 1:1 (dalam bobot). Masing-masing sediaan uji dibuat dengan mencampurkan sirup ekstrak etanolik sebanyak 15g dengan tween 80 sebanyak 0,5% b/b dari bobot total atau sebesar 0,15g. Kemudian ditambahkan larutan mukus-dapar fosfat hingga diperoleh bobot total sebesar 30g dan diaduk hingga didapatkan campuran yang homogen.

Pengukuran viskositas dilakukan menggunakan viskometer Ostwald. Sediaan uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian sediaan uji sebanyak 10mL dimasukkan ke dalam viskometer Ostwald yang diletakkan di *waterbath* sampai Ostwald tenggelam di dalam air hingga bagian yang menggelembung di atas batas garis atas Ostwald. Kemudian sediaan uji dinaikkan menggunakan pompa hingga

permukaan sediaan uji berada pada bagian yang menggelembung di atas batas garis atas Ostwald. Saat permukaan sediaan uji sudah berada di garis batas bagian atas, pompa dilepaskan dan penghitungan waktu dengan *stopwatch* dimulai. Saat permukaan sediaan uji telah mencapai batas bawah, penghitungan waktu dengan *stopwatch* dihentikan. Waktu yang dihasilkan selama permukaan sediaan uji bergerak dari garis batas atas hingga garis batas bawah dicatat. Waktu yang tercatat merupakan waktu alir dari sediaan uji. Bobot piknometer kosong terlebih dahulu ditimbang untuk pengukuran kerapatan. Sediaan uji kemudian dimasukkan ke dalam piknometer dan diinkubasi hingga suhunya mencapai suhu 37°C. Saat suhu piknometer telah menunjukkan suhu 37°C, segera piknometer ditutup dan ditimbang kemudian dicatat hasil penimbangan sebagai bobot sediaan uji dan piknometer pada suhu 37°C. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing sediaan uji. Bobot sediaan uji diperoleh dengan mengurangkan bobot sediaan uji dan piknometer dengan bobot piknometer kosong.

Analisa data

Uji aktivitas mukolitik dilakukan dengan menggunakan viskometer Ostwald dengan pembanding menggunakan air suling. Perubahan viskositas mukus setelah pemberian larutan uji dalam berbagai konsentrasi dapat dihitung menggunakan rumus berikut :

Viskositas =

$$\frac{B_j \text{ Sampel} \times t \text{ sample}}{B_j \text{ air suling} \times t \text{ air suling}} \times \eta \text{ air suling } 37^\circ\text{C}$$

Keterangan :

η = viskositas air suling

B_j = bobot jenis larutan pada 37°C (g/mL)

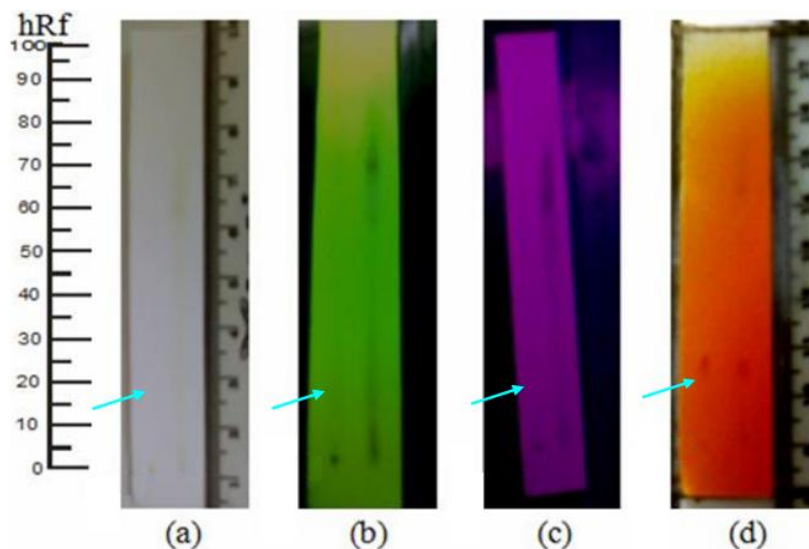
t = waktu yang dibutuhkan larutan untuk mengalir pada 37°C (detik)

Data viskositas tersebut kemudian dianalisis secara statistik, yaitu dengan uji *Shapiro-Wilk* (jumlah data ≤ 50) yang dilanjutkan dengan uji ANAVA. Bila hasilnya berbeda signifikan dilakukan uji LSD dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak bunga kembang sepatu

Rendemen yang didapatkan dari perbandingan antara bobot kering dengan bobot basah adalah sebesar 8,754% b/b. Serbuk simplisia sebesar 635,01g diekstraksi menggunakan etanol 70% menghasilkan ekstrakental sebesar 177,19g.



Gambar 1. Hasil identifikasi alkaloid menggunakan fase diam silica gel 60 F₂₅₄, fase gerak etil asetat: metanol (1:5 v/v), (a) visible; (b) UV₂₅₄; (c) UV₃₆₆; (d) pereaksi Dragendorff.

Keterangan : →: bercak alkaloid

Tabel II. Nilai pH, daya tuang, viskositas dan organoleptis masing-masing sirup

Sirup	pH	Daya Tuang (detik)	Viskositas (cps)	Organoleptis		
				Bau	Warna	Rasa
Kontrol negatif	3.46	2"22	2,8528	Aroma <i>Strawberry</i>	Merah muda	<i>Strawberry</i>
Kontrol positif	3.30	2"59	2,4848	Aroma jeruk	Kuning	Jeruk
1,00%	3.67	2"40	3,1363	Aroma <i>Strawberry</i>	Merah coklat	<i>Strawberry</i>
1,25%	3.64	3"13	3,5694	Aroma <i>Strawberry</i>	Merah coklat	<i>Strawberry</i>
1,50%	3.65	3"07	3,4742	Aroma <i>Strawberry</i>	Merah coklat	<i>Strawberry</i>
1,75%	3.75	3"27	3,6944	Aroma <i>Strawberry</i>	Merah coklat	<i>Strawberry</i>
2,00%	3.67	3"39	3,5079	Aroma <i>Strawberry</i>	Merah coklat	<i>Strawberry</i>

Rendemen ekstrak yang diperoleh dari perbandingan antara bobot ekstrak yang dihasilkan dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan adalah sebesar 27,90% b/b. Ekstrak yang dihasilkan berwarna merah kecokelatan, berbau harum dan manis, serta memiliki rasa manis.

Identifikasi senyawa alkaloid

Hasil kromatogram pada sinar tampak (Gambar 1a) berwarna samar coklat dan menunjukkan adanya peredaman saat disinari dengan sinar UV_{254nm} (Gambar 1b), sedang pada sinar UV_{366nm} tidak terjadi fluoresensi sehingga perlu dilakukan reaksi semprot untuk memastikan adanya senyawa alkaloid dalam sampel. Kromatogram disemprot menggunakan pereaksi Dragendorff (Gambar 1d) dan menunjukkan bercak berwarna oranye-kecokelatan dengan hRf 18,75. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa

dalam sirup ekstrak etanolik bunga kembang sepatu merah mengandung senyawa golongan alkaloid. Kromatogram menunjukkan hasil yang kurang spesifik karena adanya *tailing* yang dimungkinkan karena penotolan sampel yang terlalu pekat sehingga fase gerak tidak mampu memisahkan senyawa-senyawa dalam sampel dengan sempurna.

Sirup ekstrak kembang sepatu

Hasil uji pH yang dilakukan pada masing-masing konsentrasi sirup berkisar pada tiga. Pada kontrol positif menggunakan sirup Flumucil® yang mengandung asetilsistein 2,00% dan memiliki warna fisik kuning. Sirup kontrol negatif memiliki warna fisik merah muda, sedangkan pada sirup uji dengan konsentrasi 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 dan 2,00% memiliki warna merah kecokelatan yang semakin gelap seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak dalam sirup

Tabel III. Viskositas kontrol negatif, kontrol positif, sediaan uji dengan lima varian konsentrasi

Replikasi	Viskositas (cps)						
	Kontrol negatif	Kontrol positif	Konsentrasi ekstrak dalam sirup (%)				
			1,00	1,25	1,50	1,75	2,00
I	2,3049	1,5210	2,2985	2,0957	1,9099	2,3598	2,5907
II	1,9838	1,3401	1,9241	1,8456	1,8596	1,9643	2,1469
III	1,8230	1,4734	1,8310	1,7998	1,7748	1,8116	1,8885
Rata-rata	2,0372	1,4448	2,0179	1,9137	1,8481	2,0452	2,2087
SD	0,2454	0,09377	0,2475	0,1593	0,0683	0,2829	0,3552

Tabel IV. Hasil analisis uji LSD pada tiap kelompok perlakuan

Perlakuan	Kesimpulan							
	Kontrol negatif	Kontrol positif	Konsentrasi ekstrak dalam sirup (%)					
			1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	
Kontrol negatif	-	B	TB	TB	TB	TB	TB	
Kontrol positif	B	-	B	B	B	B	B	
Kons. 1,00%	TB	B	-	TB	TB	TB	TB	
Kons. 1,25%	TB	B	TB	-	TB	TB	TB	
Kons. 1,50%	TB	B	TB	TB	-	TB	TB	
Kons. 1,75%	TB	B	TB	TB	TB	-	TB	
Kons. 2,00%	TB	B	TB	TB	TB	TB	-	

Keterangan : TB : Berbeda Tidak Signifikan
B : Berbeda Signifikan

(Tabel II). Hasil uji daya tuang yang dilakukan pada masing-masing sirup baik dari sirup tanpa ekstrak, sirup asetilsistein, maupun sirup ekstrak dengan konsentrasi 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 dan 2,00% memiliki daya tuang berkisar dua hingga tiga detik. Ada penurunan nilai viskositas pada kontrol positif bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian sirup asetilsistein 2,00% sebagai agen mukolitik yang dapat menurunkan viskositas. Sedangkan pada sediaan uji dengan konsentrasi 1,00; 1,25 sampai konsentrasi 1,50% menunjukkan terjadinya penurunan viskositas ekstrak yang sebanding dengan besarnya konsentrasi ekstrak. Pada sediaan uji dengan konsentrasi ekstrak 1,75% dan 2,00% mengalami kenaikan viskositas yang sebanding dengan konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan karena pada konsentrasi ekstrak yang besar, komponen makromolekul juga makin besar (Tabel II).

Nilai viskositas yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan uji ANAVA arah dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan.

Uji Shapiro-Wilk dilakukan untuk mengetahui uji normalitas pada data. Uji Shapiro-Wilk dipilih karena data yang diuji berjumlah 21

(≤ 50 data). Dari uji Shapiro-Wilk menyebutkan bahwa data yang diperoleh terdistribusi normal karena hasil menunjukkan signifikansi sebesar 0,489 ($p > 0,05$).

Uji yang selanjutnya dilakukan *Test of Homogeneity of Variances*. Pada uji *Test of Homogeneity of Variances* menghasilkan nilai signifikansi sebesar 0,192 (probabilitas $> 0,05$) yang menunjukkan ketujuh kelompok perlakuan memiliki varian yang sama.

Dari hasil uji varian tersebut telah memenuhi syarat untuk dilakukan uji ANAVA satu arah yang dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan. Hasil dari uji ANAVA satu arah menghasilkan signifikansi sebesar 0,025 yang menunjukkan adanya perbedaan rata-rata nilai penurunan viskositas dari ketujuh perlakuan.

Penurunan viskositas mukus (Tabel IV) pada kontrol positif berbeda bermakna ($p < 0,05$) terhadap kontrol negatif dan pada masing-masing sirup dengan berbagai varian konsentrasi. Sedangkan pada sirup dengan konsentrasi 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 dan 2,00% menunjukkan hasil berbeda tidak bermakna ($p > 0,05$) terhadap kontrol negatif. Penurunan viskositas mukus masing-masing konsentrasi sirup berbeda tidak bermakna

($p > 0,05$) terhadap konsentrasi sirup satu sama lain sehingga dapat disimpulkan bahwa sirup dengan konsentrasi 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 dan 2,00% belum menunjukkan adanya aktivitas mukolitik dan belum ada yang setara dengan asetilsistein 2,00%. Hal ini disebabkan oleh viskositas awal dari mukus bervariasi pada tiap replikasi sehingga tidak dapat dibandingkan satu sama lain. Variasi viskositas pada mukus dapat disebabkan adanya isi usus yang tercampur pada mukus yang dapat mengganggu pengukuran. Usus sapi yang digunakan bukan berasal dari usus sapi yang sama dengan umur, jenis kelamin, dan *treatment* yang berbeda untuk tiap replikasi sehingga dapat memperbesar variasi. Selain itu, viskositas sirup kelompok uji masing-masing sediaan memiliki nilai yang berbeda sehingga juga dapat mempengaruhi besarnya penurunan viskositas terhadap mukus. Belum adanya parameter standar awal terhadap viskositas mukus karena tidak dilakukan pengukuran viskositas mukus terlebih dulu untuk tiap replikasi.

KESIMPULAN

Sirup ekstrak etanolik kembang sepatu merah mahkota tegak dengan konsentrasi 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 dan 2,00% tidak menunjukkan adanya aktivitas mukolitik secara *in vitro* dengan menurunkan viskositas mukus usus sapi. Aktivitas mukolitik sirup ekstrak etanolik bunga kembang sepatu merah mahkota tegak dengan konsentrasi 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 dan 2,00% tidak ada yang sebanding dengan aktivitas mukolitik sirup asetilsistein 2,00%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Seluruh jajaran dosen, staf tata usaha, serta pegawai di bagian Biologi Farmasi, Farmasetika, Kimia Farmasi, serta Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi UGM.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 1985. *Tanaman Obat Indonesia*, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim. 2009. Getting Started with v8 of Design-Expert® Software, <http://www.statease.com/>, diakses tanggal 9 Mei 2011.
- Fitria, A. 2009. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid Ekstrak Etanolik Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Heyne, K. 1950. *Tumbuhan Berguna Indonesia*, diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Jilid Ketiga, Cetakan Pertama, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta. pp 1309.
- Hidayati, R. 2010. Optimasi Formulasi Sirup Fraksi Alkaloid Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) Warna Merah, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Lande, S.Y. 2009. Aktivitas Mukolitik Ekstrak Etanolik Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) pada Mukus Usus Sapi secara *In Vitro* dengan Viskometer Ostwald, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.