

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK DAN FRAKSI EKSTRAK
DAUN RAMI (*BOEHMERIA VIRGATA* (FORST.) GUILL
TERHADAP BEBERAPA MIKROBA ORGANISME**

Arsyik Ibrahim

*Kelompok Bidang Ilmu Biologi Farmasi, UP. Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Samarinda
e-mail : achie.ibrahim@gmail.com*

ABSTRACT

*This study aims to the antimicrobial activity test of leaf extract of *B. virgata*, and the Minimum Inhibitory Concentration values determine to against some microbes with solid dilution method. The materials in maceration with methanol were obtained with 500 grams, than partitioned with solid liquid partition method to use *n*-hexane, methanol-soluble extract obtained by *n*-hexane and methanol extracts insoluble *n*-hexane, both extracts was chemical component monitoring with Thin Layer Chromatography (TLC), then tested with solid dilution method its activity. Antimicrobial activity test results from both types of extracts, methanol extract soluble fraction of *n*-hexane showed better than activity methanol extract of insoluble fraction of *n*-hexane, because it can inhibit the growth of the bacteria *E. coli*, *V. cholerae* and *S. thyposa*, while the methanol extract of *n*-hexane insoluble only able to inhibit the bacteria *V. cholerae*, methanol-soluble extract fraction of *n*-hexane as the active extracts 1000 ug / ml medium that can kill or inhibit of microbes the growth.*

Keywords: *Leaf *B. virgata*, Antimicrobial, Methanol extract soluble and insoluble *n*-hexane, Solid Dilution*

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antimikroba ekstrak daun *B. virgata*, dan menentukan nilai Kadar Hambat Minimum dengan metode dilusi padat terhadap beberapa mikroba uji. Bahan uji diperoleh dengan maserasi 500 gram daun dengan metanol yang dilanjutkan dipartisi dengan *n*-heksan dengan metode partisi padat cair, diperoleh ekstrak metanol larut *n*-heksan dan ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan, kedua ekstrak ini dimonitoring komponen kimianya dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), kemudian diuji aktivitasnya dengan metode dilusi padat. Hasil uji aktivitas antimikroba dari kedua jenis ekstrak yang diuji, fraksi ekstrak metanol larut *n*-heksan menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan fraksi ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan, karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *V. cholerae* dan *S. thyposa*, sedangkan ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan hanya mampu menghambat bakteri *V. cholerae*, Fraksi ekstrak metanol larut *n*-heksan sebagai ekstrak aktif yang dapat membunuh/menghambat pertumbuhan mikroba 1000 µg/mL medium.

Kata Kunci: Daun *B. virgata*, Antimikroba, Ekstrak metanol larut dan tidak larut *n*-heksan, Dilusi Padat

PENDAHULUAN

Saat ini obat antimikroba standar yang ada sekarang semakin berkurang efektivitasnya, karena banyak bakteri patogen sudah mulai resisten terhadap antimikroba yang digunakan saat ini. Tingginya kasus infeksi baik yang endemik maupun epidemik serta penggunaan obat-obat yang terus menerus merupakan faktor-faktor yang diduga sebagai penyebab terjadinya resistensi obat.

Besarnya potensi alam flora yang kita miliki memungkinkan kita melakukan riset untuk memperoleh senyawa aktif yang berkhasiat sebagai antimikroba. Hal ini mungkin dapat menjawab kebutuhan pasar akan obat-obat baru baik domestik maupun internasional [1].

Salah satu tumbuhan yang mempunyai potensi ekonomis sangat tinggi untuk dimanfaatkan adalah tumbuhan *Boehmeria*. *Boehmeria* merupakan tumbuhan dari suku *Urticaceae*, tumbuhan ini terdiri dari 2 jenis yaitu *B. nivea* dan *B. virgata*. *B. nivea* mengandung β -sitosterol, daucosterol dan asam 19 α -hidroksiursolik [2], selain itu mengandung zat-zat gizi diantaranya: mineral, protein, lisin dan karoten, yang hingga saat ini pemanfaatannya masih sebatas sebagai pakan ternak unggas dan babi.

Beberapa penelitian ilmiah tentang *B. nivea* yang telah dilaporkan diantaranya: efek anti-oksidan dari ekstrak air *B. var. nivea* dan *var. tanacissima* pada tikus yang sebelumnya telah diinduksikan dengan CCl_4 , dapat menurunkan kadar lipid peroksida pada hati tikus [2]. Selain itu serat *Boehmeria* dari spesies *B. nivea* yang diberikan pada kelinci jantan umur 44 hari dengan berat badan awal 29,85 g, konsentrasi pemberian 20% dan 40%, setelah sehari pemberian berat badan

kelinci turun hingga 28,95 g dan 25,60 g [3].

Mikroba uji yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bakteri dan jamur. Bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella thyposa*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* dan 1 jenis kapang/khamir yaitu *Candida albicans*.

Dalam rangka pemanfaatan bahan alam dari daun *B. Virgata* sebagai obat diperlukan penelitian mendasar dan komprehensif untuk memperoleh informasi hubungan kandungan kimia terhadap aktivitas biologi daun *B. Virgata*. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antimikroba ekstrak dan fraksi ekstrak daun *B. virgata*, dan menentukan nilai Kadar Hambat Minimum dengan metode dilusi padat terhadap beberapa mikroba uji.

METODE

Bahan tumbuhan.

Sampel yang digunakan berupa daun *B. virgata*, metanol teknis, n-hexan, kloramfenikol, dimetil sulfoksid (DMSO), ketokonazol, larutan NaCl fisiologis 0,9%, medium Glukosa Nutrien Agar (GNA), medium Potato Dekstrosa Agar (PDA), alkohol 70%.

Biakan Mikroba Uji

Escherichia coli, *Vibrio cholerae*, *Salmonella thyposa*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* dan 1 jenis kapang/khamir yaitu *Candida albicans*.

Alat-alat yang digunakan.

Batang pengaduk, bejana maserasi, botol pengencer, botol semprot, cawan Petri,

chamber, corong, corong pisah 500 mL, *drigle sky*, gelas kimia 250 mL, gelas ukur 10, 50 dan 100 mL, inkubator, labu erlenmeyer 500 mL, labu tentukur 50 mL, *laminar air flow* (LAF), lampu spiritus, lampu UV 254 nm dan 366 nm, lempeng KLT PF₂₅₄ (E.Merck), otoklaf, oven, rotavapor, seperangkat alat sentrifuga, tabung reaksi, timbangan analitik, timbangan kasar.

Pengolahan dan ekstraksi.

Daun *B. virgata* yang telah dikumpulkan dibersihkan dan dicuci dengan air, setelah dipisahkan bagian yang tidak diperlukan, kemudian diangin-anginkan hingga kering di tempat yang tidak terpapar langsung sinar matahari. Daun yang telah kering kemudian dipotong-potong kecil dan siap digunakan sebagai bahan penelitian.

Ekstraksi dan partisi.

Sebanyak 500 g daun *B. virgata* kering, di serbukkan, kemudian diekstraksi secara maserasi menggunakan cairan penyari metanol. Filtrat disaring dan residu direndam lagi dalam pelarut yang sama selama 3 x 24 jam. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan menggunakan *rotavapor* hingga diperoleh ekstrak metanol kering/ Ekstrak metanol kering selanjutnya dipartisi dengan *n*-heksan dengan metode partisi padat-cair dengan cara larutan disentrifuga pada kecepatan 1500 rpm, maka diperoleh ekstrak metanol larut *n*-heksan dan ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan.

Pemisahan Senyawa Metode Kromatografi Lapis Tipis.

Ekstrak metanol larut *n*-heksan dan ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan, hasil partisi dimonitor komponen kimianya dengan menggunakan lempeng KLT menggunakan variasi eluent *n*-heksan : etil asetat (9:1),

(7:1) dan (5:1) untuk mengetahui keberhasilan partisi yang dilakukan. Spot hasil KLT diamati di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm dan reagen semprot H₂SO₄ 10%.

Pengujian aktivitas antimikroba.

Ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan daun *B. virgata* kering dan ekstrak metanol larut *n*-heksan diuji aktivitasnya terhadap beberapa mikroba uji dengan metode dilusi padat. Pengujian ekstrak metanol larut *n*-heksan dan ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan dilakukan dengan menimbang 10 mg ekstrak, kemudian dimasukkan ke dalam vial steril dan dilarutkan dengan 200 μ L (0,2 mL) DMSO dan 9,8 ml medium GNA atau PDA, diperoleh konsentrasi 1 mg/mL, dihomogenkan. Campuran ekstrak dan medium GNA dituang ke dalam cawan Petri steril dan dibiarkan memadat. Tiap cawan Petri dibagi tiga zona untuk 3 bakteri uji, dan untuk medium uji Pda dibagi 1 zona untuk khamir *C. albicans*. Setelah media memadat di tambahkan 20 μ L suspensi mikroba uji. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

Data penelitian berupa profil KLT hasil pengamatan lampu UV 254 nm dan 366 nm, dan aktivitas ekstrak metanol larut *n*-heksan dan ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan daun *B. virgata* berupa data kualitatif dengan melihat penghambatan pertumbuhan bakteri uji merupakan data Kadar Hambat Minimum, dan pembunuhan bakteri uji merupakan data Kadar Bunuh Minimum. Analisis data akhir dari aktivitas ekstrak metanol larut *n*-heksan dan ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan daun *B. virgata* menggunakan metode kualitatif-deskriptif dengan melihat secara visual aktivitas penghambatan dan pembunuhan bakteri uji aktivitas dari masing-masing ekstrak daun *B. virgata*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. PENYARIAN SAMPEL

Sampel daun *B. virgata* disari dengan metode maserasi yang merupakan proses penyarian secara dingin dan paling sederhana diantara metode lain, yaitu dengan cara merendam sampel dalam cairan penyari yang sesuai. Daun *B. virgata* yang telah dikumpulkan dibersihkan dan dicuci dengan air untuk menghilangkan serangga atau kotoran-kotoran lain yang melekat pada helaian daun, setelah dipisahkan bagian yang tidak diperlukan, kemudian diangin-anginkan hingga kering di tempat yang tidak terpapar langsung sinar matahari.

Selanjutnya daun yang telah kering kemudian diserbukkan dan direndam dalam cairan penyari metanol. Maksud pemotongan daun adalah untuk memperluas permukaan bidang sentuhan antara metanol dan daun, dengan demikian penyarian dapat lebih efektif. Penggunaan cairan penyari metanol pada penelitian ini karena bersifat semipolar sehingga dapat menyari komponen kimia yang bersifat polar maupun non polar, sehingga diharapkan semua komponen kimia dalam sampel relatif akan terekstraksi. Pada saat perendaman daun dalam metanol, konsentrasi diluar sel lebih tinggi daripada di dalam sel sehingga isi sel termasuk zat aktifnya akan keluar dan terlarut dalam metanol. Proses penyarian dilakukan berulang-ulang dengan mengganti cairan penyari yang baru pada sampel yang sama hingga penyarian sempurna (cairan pelarut nampak tidak berwarna).

Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian dipekatan menggunakan rotavapor sampai diperoleh ekstrak metanol kental, selanjutnya dilakukan penguapan maksimal hingga ekstrak menjadi kering, ekstrak

metanol kering diperoleh sebanyak 35,16 gram. Ekstrak metanol kering selanjutnya dipartisi dengan *n*-heksan dengan metode partisi padat-cair, partisi dilakukan bertujuan untuk memisahkan komponen kimia berdasarkan tingkat kepolarannya.

Prinsip partisi ini pada umumnya menggunakan satu macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang lebih rendah dari pelarut ekstrak yang dipartisi. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan dengan kepolaran lebih rendah adalah *n*-heksan yang akan melarutkan senyawa kimia yang bersifat relatif non polar, sedangkan pelarut yang kepolarannya lebih tinggi adalah metanol yang akan melarutkan senyawa kimia yang bersifat relatif polar. Dari hasil partisi metanol diperoleh ekstrak metanol larut *n*-heksan dan ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan dengan bobot masing-masing adalah 23,02 gram dan 8,30 gram, kedua ekstrak ini dimonitoring komponen kimianya dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), (Gambar 1).

Ekstrak hasil partisi selanjutnya diuji aktivitas antimikrobanya menggunakan 5 macam jenis bakteri yaitu : *Escherichia coli* (EC), *Vibrio cholerae* (VC), *Salmonella thyposa* (ST), *Bacillus subtilis* (BS) dan *Staphylococcus aureus* (SA) dan 1 jenis kapang/khamir yaitu *Candida albicans* (CA).

B. UJI ANTIMIKROBA

Skrining aktifitas antimikroba dilakukan terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyposa*, dan *Vibrio cholera*, sedangkan untuk jamur digunakan *Candida albicans*. Dasar pemilihan mikroba uji ini adalah karena keempatnya merupakan merupakan bakteri patogen yaitu untuk *Escherichia coli*, *Salmonella thyposa* dan

Vibrio cholerae merupakan bakteri anaerobik fakultatif gram negatif yang bersifat patogenik penyebab utama diare kronik, tifoid dan kolera. Selain itu bakteri-bakteri ini dapat menyebabkan penyakit disuria akibat infeksi saluran kemih misalnya penyakit pielitis, inflamasi uregenital dan kejang uterus akibat infeksi uterus pasca persalinan oleh toksin bakteri, misalnya penyakit sepsis puerperalis. *Bacillus subtilis* merupakan bakteri berbentuk basil berspora (endospora) yang bersifat gram positif dapat menyebabkan penyakit mata, infeksi kulit (luka, bisul, borok). *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri kokus katalase positif gram positif yang bersifat patogenik, mikroba ini dapat menyebabkan penyakit meningitis, endokarditis, infeksi kulit (luka), keracunan makanan dan infeksi saluran kemih misalnya penyakit sistitis. *Vibrio cholerae* dapat menyebabkan penyakit colera, selain itu bakteri ini dapat menyebabkan penyakit gastroenteritis (radang lambung), sedangkan *Candida albicans* merupakan jamur yang bersifat patogenik penyebab thrush (sariawan/guam) dan vaginitis atau keputihan [4]. Pada tahap skrining aktivitas antimikroba, digunakan metode dilusi padat karena pengerjaan dengan metode ini menghemat waktu serta kontaminasi selama pengerjaan dapat diminimalkan. Ekstrak dikatakan aktif jika pada konsentrasi $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$ mampu membunuh / menghambat pertumbuhan mikroba uji dengan tidak adanya pertumbuhan mikroba pada permukaan media pertumbuhan. Proses pengujian dilakukan dengan cara sejumlah $5 \mu\text{L}$ mikroba uji diratakan di atas media agar padat dengan menggunakan alat *drigalsky* (metode dilusi padat). Oleh karena hasil dari metode ini diamati melalui pengamatan visual, maka ketelitian jumlah pengambilan ekstrak dan mikroba uji sangat diperlukan untuk dapat

membandingkan potensi ekstrak dalam menghambat pertumbuhan mikroba. Adanya aktifitas antibakteri atau antijamur ditandai dengan terbentuknya zona hambatan yang bersifat radikal atau iradikal. Zona radikal tampak berupa daerah yang jernih tanpa terlihat pertumbuhan mikroba uji, sedangkan zona iradikal masih ada pertumbuhan mikroba tetapi dihambat atau pertumbuhan itu lebih kecil dibanding pertumbuhan yang tidak dihambat, oleh karena itu zona iradikal berupa zona yang keruh tetapi masih lebih jernih dibandingkan pertumbuhan disekitarnya. Kloramfenikol dipilih sebagai kontrol positif pada uji aktivitas antibakteri karena berspektrum luas yaitu efektif untuk bakteri gram positif dan gram negatif serta mikroorganisme yang lain dengan mekanisme menghambat sintesis protein dengan mencegah ujung aminoasil *t*-RNA bergabung dengan peptidil transferase (enzim yang menghubungkan asam amino dengan rantai peptida selama proses sintesis protein) [5], bersifat mudah larut dalam lemak sehingga menembus sel bakteri. Antibiotika ketokonazol digunakan sebagai kontrol positif pada uji aktivitas antijamur. Ketoko-nazol merupakan senyawa turunan imidazol, aktifitas antijamurnya berinteraksi dengan C-14 α -demetilase untuk menghambat demetilase lanosterol menjadi ergosterol yang merupakan sterol penting untuk membran jamur sehingga mengganggu fungsi membran, menimbulkan ketidakteraturan membran sitoplasma jamur dan mempengaruhi biosintesis ergosterol, dan meningkatkan permeabilitas membran [5].

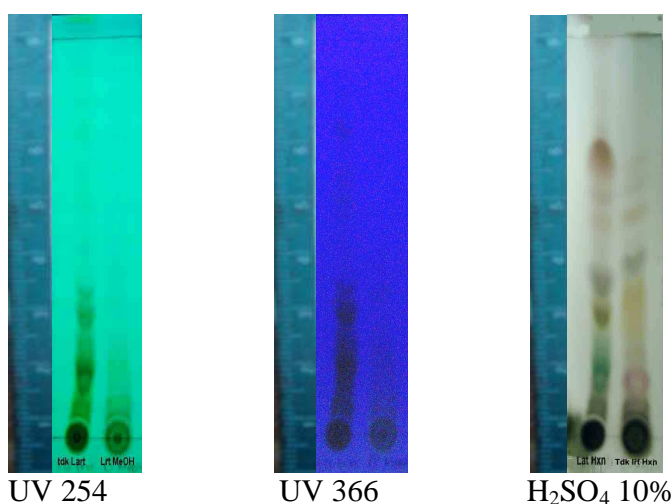
Berdasarkan hasil uji skrining dari kedua jenis ekstrak yang diuji, ekstrak n-heksan menunjukkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak metanol, karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *V. cholerae* dan *S. thyposa*, sedangkan ekstrak metanol hanya mampu

menghambat bakteri *V. cholerae* (Gambar 2).

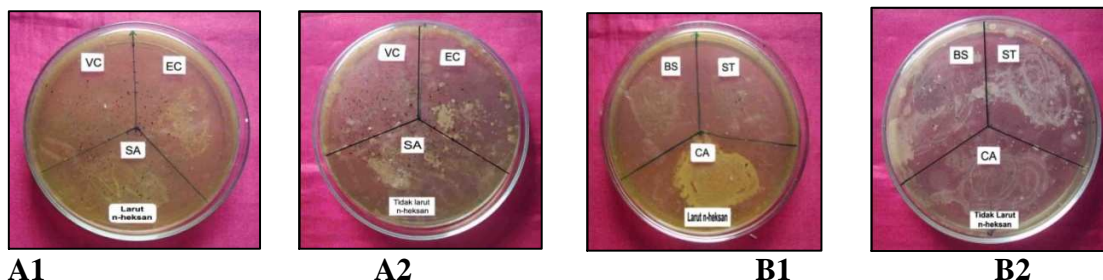
Namun demikian, baik ekstrak metanol larut *n*-heksan maupun ekstrak metanol tidak larut *n*-heksan kurang menghambat bakteri *B. subtilis*, *S. aureus* dan jamur *C. albicans*. Jadi senyawa aktif yang potensial untuk diisolasi dan dikembangkan dari daun *B. virgata* sebagai bahan antimikroba adalah yang terdapat pada ekstrak metanol larut *n*-heksan, hal ini dapat dilihat pada Tabel 1. Ekstrak metanol larut *n*-heksan sebagai ekstrak aktif yang dapat membunuh/menghambat pertumbuhan mikroba 1000 $\mu\text{g/mL}$ medium. Hal ini menunjukkan bahwa walaupun ketiga bakteri tersebut memiliki struktur dan komponen penyusun dinding sel yang sama, yaitu dinding sel bakteri gram negatif mempunyai dua lapisan dinding sel yaitu lapisan luar yang tersusun atas lipopolisakarida dan protein serta lapisan dalam tersusun atas lapisan peptidoglikan [2], namun susunan kimiawi serta struktur peptidoglikan bervariasi dari satu spesies bakteri ke spesies bakteri yang lain. *n*-asetilglukosamin dan asam *n*-asetil

muramat merupakan komponen konstan peptidoglikan, namun ada keragaman pada asam-asam amino yang ada dan pada sifat ikatan antara asam-asam amino ini [6].

Mekanisme penghambatan atau terbunuhnya mikroba pada uji skrining ekstrak methanol larut *n*-heksan dan ekstrak methanol tidak larut heksan pada bakteri gram negatif adalah diduga bekerja menghambat sintesis dinding sel bakteri. Senyawa aktif yang terdapat dalam daun *B. virgata* memiliki kelarutan dalam lemak yang tinggi (bersifat non polar), dimana komposisi dinding sel bakteri gram negatif memiliki kandungan lemak yang tinggi (11–22 %) [6]. Senyawa aktif yang mampu menembus dinding sel dapat menghambat sintesis dinding sel menyebabkan terjadinya kerusakan dinding sel akibat perbedaan tekanan osmotik di dalam dan di luar yang berakibat fungsi integritas sel mengalami lisis. Oleh karena itu, setiap zat yang mampu merusak dinding sel atau mencegah sintesisnya, akan menyebabkan terbentuknya sel-sel yang peka terhadap tekanan osmotik [4].



Gambar 1. Profil kromatogram ekstrak metanol larut dan tidak larut *n*-heksan daun *B. virgata* (Fase Diam: Silika Gel G 60 F 254, Fase Gerak: *n*-heksan : Etil asetat (9 : 1), Penampak noda : UV 254 nm, UV 366 nm dan H_2SO_4 10%)



A1 **A2** **B1** **B2**
 Gambar 2. Aktivitas antimikroba ekstrak metanol larut n-heksan dan ekstrak metanol tidak larut n-heksan pada konsentrasi 1000 µg/mL

Keterangan :

- A1, A2 : Larut n-Heksan
- B1, B2 : Tidak larut n-Heksan
- EC : *Escherichia coli*
- VC : *Vibrio cholerae*
- SA : *Staphylococcus aureus*
- ST : *Salmonella thyposa*
- BS : *Bacillus subtilis*
- CA : *Candida albicans*
- Medium : Glukosa Nutrien Agar (GNA)
- Waktu inkubasi : 1 x 24 jam, 37°C (bakteri); 2 x 24 jam (jamur)

Tabel 1. Hasil skrining aktivitas antimikroba ekstrak metanol larut n-heksan dan ekstrak metanol tidak larut n-heksan pada konsentrasi 1000 µg/mL

Sampel	Ekstrak	Mikroba Uji					
		VC	ST	EC	BS	SA	CA
<i>B. virgata</i>	Larut n-heksan	++	+	+	-	-	-
	Tidak larut n-heksan	+	-	-	-	+	-
	K+ (antibakteri)	++	++	++	++	++	-
Kontrol	K+ (antijamur)	-	-	-	-	-	++
	K- (DMSO)	-	-	-	-	-	-

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa

- Fraksi ekstrak metanol larut n-heksan menunjukkan aktivitas terhadap bakteri *E. coli*, *V. cholerae* dan *S. thyposa*, sedangkan fraksi ekstrak metanol tidak larut n-heksan menunjukan aktivitas terhadap bakteri *V. Cholerae* dan *Staphylococcus aureus*,
- Fraksi ekstrak metanol larut n-heksan dan tidak larut n-heksan dapat

membunuh/menghambat pertumbuhan mikroba pada konsentrasi 1000 ug/mL medium.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada UP. Fakultas Farmasi UNMUL, yang telah memberikan dana penelitian serta Kepala Laboratorium Biologi dan Mikrobiologi dan Laboratorium Bahan Alam UP. Fakultas Farmasi UNMUL atas izin menggunakan laboratorium untuk penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Padmawinata. K. **1995**. *Potensi, Peluang dan Kendala Pengembangan Agroindustri Tanaman Obat*. BALITRO.
2. Lin, C.C.; Yen, M.H.; Lo, T.S.; & Lin, J.M. **1998**. Evaluation of the Hepatoprotective and Antioxidant Activity of *Boehmeria nivea* var. *nivea* and *B. nivea* var. *tenacissima*. *J. Ethnopharmacol.* 60 (1) : 9 – 17.
3. Gabbia, A.; M. Vegas, J.; Toledo, S.; Iora, A.; Fronza, L.; & Carlotto, S. **2002**. Increasing Level of Ramie (*Boehmeria nivea*) Hay on the Diets of Fattening Rabbits. *J. Application Rabbit.* 97 : 105 - 900.
4. Syahrurrahman, A.; Chatim, A., Subandrio, A.; Karuniawati, A.; Triyatni, R. M.; Utji, R.; & Sardjito, R., **1994**. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Binarupa Aksara; Jakarta. 7 - 10, 163.
5. Olson, J. **2004**. *Belajar Mudah Farmakologi*. Cetakan 1; EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
6. Pelczar, Jr.J.M.; & Chan, E.C.S. **1986**. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Hadiutomo. R.S. dkk. Cetakan Pertama. Universitas Indonesia Press; Jakarta. 115. 189 - 190.