

Research Report

Uji toksisitas tanin dari kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) terhadap sel fibroblas BHK - 21

(Toxicity of tannins from Mangosteen (*Garcinia mangostana L.*) pericarp to fibroblast BHK – 21)

Fikarini Hadi P.¹, Dian Agustin W.², Febriastuti Cahyani²

¹Mahasiswa Pendidikan Dokter Gigi

²Staf Pengajar Departemen Konservasi Gigi Kedokteran Gigi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

Surabaya-Indonesia

ABSTRACT

Background : Oral disease is a problem suffered by 90% of the population in Indonesia. Problems encountered in the field of dentistry today is almost all materials used in dental root canal treatment is a chemical and have harmful side effects of material which is a therapeutic agent or active and toxic chemicals. One alternative materials that can be used is mangosteen (*Garcinia mangostana L.*). Active compound content of the mangosteen pericarp extract has good potential in supporting the success of root canal treatment, but any materials used in dentistry must fulfill the terms of biocompatibility. **Purpose:** The aim of this study was to find out the toxicity of tannin from mangosteen pericarp extract to BHK – 21 fibroblast cell. **Method:** 35,22% tannins that obtained from the extraction of mangosteen pericarp equated to 100%. Tannin from mangosteen pericarp extract at the concentration 1,5%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% and 100% applied on BHK – 21 fibroblast cell. Toxicity of the substance can be seen from the ability of cells to proliferate after treatment and was calculate by the percentage of viable cell formula. Cell which capable to proliferate will produce mitochondrial enzyme through the respiration process that can be measured using MTT assay method by ELISA reader. **Result:** Percentage of viable cell BHK – 21 fibroblast cell culture exposed to the concentration of 1,5%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% and 100% were 110,7%, 110,7%, 68%, 76,8%, 81,6%, 99,6% and 90,5%. **Conclusion:** Tannins from the mangosteen peel extract exhibits slightly toxic at concentrations of 2,2% and is not toxic at concentrations of less than 2,2%..

Keywords: Tannins, Mangosteen pericarp extract, toxicity

Korespondensi (*correspondence*): 1. Fikarini Hadi P, Mahasiswa Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Prof. Moestopo 48, Surabaya. Email : fikarini.h.p.021111114@gmail.com

PENDAHULUAN

Masalah kesehatan gigi dan mulut merupakan masalah yang sering ditemukan pada masyarakat di negara berkembang. Penyakit gigi dan mulut merupakan masalah yang di derita oleh 90% penduduk di Indonesia. Karies gigi dapat menyebabkan bakteri menginvasi pulpa sehingga terjadi respons peradangan pulpa. Peradangan pulpa ini akan berlanjut dan dapat menyebabkan nekrosis pulpa¹. Gigi dengan peradangan pada pulpa yang bersifat ireversibel dan berlanjut dengan kerusakan periapikal

memerlukan perawatan saluran akar. Tujuan dari perawatan saluran akar adalah untuk mengeliminasi mikroorganisma saluran akar gigi. Masalah yang dihadapi di bidang kedokteran gigi saat ini adalah hampir semua bahan yang dipakai dalam perawatan saluran akar gigi merupakan bahan kimia dan memiliki efek samping berbahaya dari material yang merupakan agen terapeutik atau kimia yang aktif dan toksik².

Penelitian-penelitian di Indonesia saat ini banyak dilakukan untuk mencari bahan-bahan pengganti bahan kimia dengan memakai bahan dasar yang dapat diperoleh dari lingkungan alam yang ada di Indonesia. Bahan yang dapat dijadikan pilihan sebagai bahan alternatif dalam perawatan saluran akar salah satunya adalah manggis (*Garcinia mangostana*)³. Manggis merupakan tumbuhan fungsional karena sebagian besar dari tumbuhan tersebut dapat dimanfaatkan sebagai obat. Kulit buah manggis mengandung berbagai senyawa seperti *mangostin*, *tannin*, *xanthone*, *crysanthemine*, *garcinone*, *gartanin*, vitamin B1, B2, *terpen*, *anthocyanin*, *phenol* dan zat bioaktif lainnya^{4,5}.

Tanin terdapat secara meluas dalam dunia tumbuh – tumbuhan, antara lain terdapat pada bagian kulit kayu, batang, daun dan buah – buahan, yang mempunyai peranan penting dalam proteksi dan regulasi pertumbuhan. Tanin merupakan salah satu senyawa turunan dari polifenol yang terkandung banyak dalam ekstrak kulit buah manggis, yaitu sekitar 11,8%⁶. Beberapa aktivitas kimia tanin antara lain apoptosis, antitumor, antibakteri dan antiplasmin⁷. Bansa membuktikan bahwa aktifitas antimikroba tannin pada beberapa mikroba dengan rentang MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 4,0 mg/ml hingga 5,5 mg/ml, sedangkan MBC (Minimum Bactericidal Concentration) sebesar 4,5 mg/ml hingga 6,0 mg/ml⁸. Namun pada konsentrasi tinggi, tannin dapat menyebabkan iritasi pada membrane mukosa⁹.

Kandungan senyawa aktif dari ekstrak buah manggis tersebut memiliki potensi yang baik dalam mendukung keberhasilan dalam perawatan saluran akar, namun setiap bahan yang dipakai di bidang kedokteran gigi harus memenuhi syarat-syarat biokompatibilitas, yaitu tidak membahayakan pulpa dan jaringan lunak, tidak mengandung substansi yang bisa menyebabkan respon sistemik bila berdifusi dan diadopsi ke dalam sistem sirkulasi. Suatu bahan baru harus melewati uji klinis sehingga didapatkan informansi tentang biokompatibilitas bahan tersebut, Salah satu uji klinis untuk

menentukan biokompatibilitas suatu bahan adalah uji toksisitas.

Salah satu metode dalam uji toksisitas adalah dengan metode uji enzimatis yang menggunakan pereaksi MTT (Methylthiazolyldiphenyl tetra bromide) assay. Uji enzimatis ini bertujuan untuk mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel¹⁰. Pengamatan toksistas ini dapat menjadi salah satu indikator untuk mengetahui pengaruh konsentrasi dan paparan terhadap suatu substansi.

Berdasarkan standar penggunaan suatu bahan baru, diperlukan suatu uji toksisitas untuk mengetahui toksisitas senyawa aktif tannin pada ekstrak manggis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan konsentrasi yang efektif dan tidak toksik terhadap jaringan pulpa dan periapikal sehingga dapat digunakan dalam perawatan kesehatan gigi dan mulut.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *post test only control group design*. Buah manggis yang digunakan sebagai sampel berasal dari UPT Materia Medika, Batu, Malang.

Isolasi tanin didapatkan dari proses ekstraksi kulit buah manggis jenis *Garcinia mangostana* dengan metode maserasi yang dilarutkan dalam larutan alkohol 90%, dilanjutkan dengan ekstraksi senyawa aktif tanin yang menggunakan pelarut acetol alcohol. Isolasi tanin yang didapatkan dari ekstrak kulit manggis sebesar 35,22% disetarakan dengan 100% untuk mempermudah perhitungan. Isolasi tersebut dilakukan pengenceran dengan media *eagle* dan *Fetal Bovine Serum* (FBS) sehingga didapatkan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,5%.

Sel fibroblast BHK-21 yang sudah didistribusikan dalam *well* (sumuran) dibagi dalam 10 kelompok perlakuan yaitu kelompok I sebagai kontrol sel, kelompok II sebagai kontrol media, kelompok III dipapar dengan ekstrak tanin dari kulit manggis dengan konsentrasi 100%, kelompok IV dipapar dengan ekstrak tanin dari kulit manggis dengan konsentrasi 50%, kelompok V dipapar dengan ekstrak tanin dari kulit manggis dengan konsentrasi 25%,

kelompok VI dipapar dengan ekstrak tanin dari kulit manggis dengan konsentrasi 12.5%, kelompok VII dipapar dengan ekstrak tanin dari kulit manggis dengan konsentrasi 6.25%, kelompok VIII dipapar dengan ekstrak tanin dari kulit manggis dengan konsentrasi 3.125% dan kelompok IX dipapar dengan ekstrak tanin dari kulit manggis dengan konsentrasi 1.5%. Replikasi pada masing – masing konsentrasi sebanyak 5 pada *microplate 48well*.

Setelah dilakukan paparan sesuai kelompok konsentrasi, dilanjutkan dengan pengamatan dan pembacaan hasil. Garam tetrazolium (MTT) dilarutkan dalam *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) 5 mg/mL. Media sel dibuang, kemudian dicuci dengan PBS dan MTT ditambahkan secara langsung sebanyak 10 µl. Kemudian diinkubasi kembali selama kurang lebih 4 jam pada suhu 37° C. Seluruh media dalam sumuran dan bahan uji diambil. Kemudian, setiap sumuran ditambahkan DMSO (*Dimethylsulfoxide*) sebanyak 50 µl, kemudian diaduk dengan *Plate Shaker* selama 5 menit. Sel fibroblas yang hidup yang akan terwarnai dengan formazan menjadi biru, sedangkan yang mati tidak terbentuk warna biru. Selanjutnya formazan dibaca absorbansinya secara *spektrofotometri* dengan *ELISA reader* dengan panjang gelombang 620 nm. Data di analisa menggunakan rumus persentase hidup (freshney, 2010) yaitu dengan pembagian antara selisih *optical density* perlakuan – media dan selisih *optical density* kontrol – media, kemudian dikalikan 100%.

Tingkat toksisitas dapat dikelompokkan menurut klasifikasi jumlah sel yang hidup menurut Heravit *et al*¹¹. Jika sel yang hidup lebih dari 90% dapat diklasifikasikan sebagai non – sitotoksik. Jika sel yang hidup diantara 60% hingga 90% dapat diklasifikasikan sebagai sedikit sitotoksik. Jika sel yang hidup diantara 30% hingga 59% dapat diklasifikasikan sebagai cukup sitotoksik. Jika sel yang hidup kurang dari 30% dapat diklasifikasikan sebagai sangat sitotoksik.

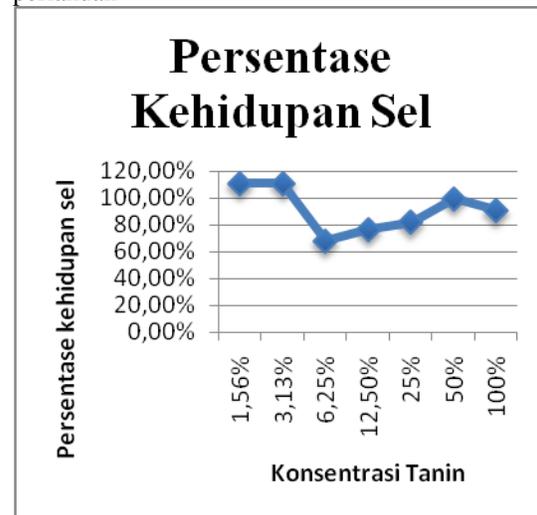
HASIL

Penelitian uji toksisitas tanin dari ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) menggunakan metode MTT assay menggunakan

pembacaan melalui *ELISA reader*. *ELISA reader* bekerja dengan cara membaca nilai absorbansi (*optical density*) melalui perubahan warna yang dihasilkan oleh aktivitas mitokondria menjadi biru formazan. Pekatnya warna yang dihasilkan mengakibatkan nilai absorbansi tinggi pada *ELISA reader*.

Berdasarkan *optical density*, dapat diketahui persentase sel yang hidup. Semakin tinggi angka *optical density*, maka semakin banyak jumlah sel fibroblas yang hidup atau berproliferasi. Perhitungan persentase jumlah sel yang hidup didapat melalui rumus presentase sel hidup. Berdasarkan hasil pengamatan dan pembacaan nilai absorbansi uji toksisitas tanin kulit manggis pada sel fibroblas BHK-21, didapatkan hasil sebagai berikut :

Gambar 1. Grafik kemampuan proliferasi sel setelah perlakuan



Gambar 1 menunjukkan persentase kehidupan sel fibroblas yang mendapatkan perlakuan tanin kulit manggis dengan berbagai konsentrasi. Konsentrasi 100% setara dengan 35,22% isolasi tanin dari ekstrak kulit manggis, konsentrasi 50% setara dengan 17,61% hasil isolasi tanin dari kulit manggis, demikian seterusnya hingga 1,56%.

Berdasarkan penelitian, didapatkan nilai kemampuan proliferasi sel dalam 7 kelompok perlakuan. Pada gambar 5.1 terlihat bahwa pada konsentrasi 1,5% dan 3,125% menghasilkan tingkat kemampuan proliferasi sel yang tinggi, yang menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut bersifat tidak toksik. Pada konsentasi

6,25%, tanin ekstrak kulit manggis mulai menunjukkan aktivitas toksisitas yang ditandai dengan menurunnya kemampuan proliferasi sel. Pada konsentrasi 12,5% , 25%, 50%, dan 100% menunjukkan hasil yang *false positive*.

Pada analisa data, sebelum dilakukan *analysis comparison test* setiap kelompok terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan uji Kolmogrov – Smirnov. Hasil uji normalitas tersebut menunjukkan bahwa semua kelompok memiliki nilai p lebih besar dari α 5% ($p > 0.05$) mengindikasikan bahwa data tersebut berdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji One – Way ANOVA untuk mengetahui homogenitas dan signifikansi seluruh kelompok, namun dalam uji Levene, diketahui nilai p sebesar 0,012 yang mengindikasikan bahwa data tidak homogen sehingga digunakan uji *non - parametric* menggunakan uji Kruskal Wallis. Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan p sebesar 0,000, mengindikasikan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel fibroblast BHK – 21 pada setiap kelompok.

Tabel 1. Hasil uji Mann – Whitney pada setiap kelompok perlakuan

(%)	1,5	3,125	6,25	12,5	25	50	100
1,5							
3,125	0,917						
6,25	0,009*	0,009*					
12,5	0,009*	0,009*	0,009*				
25	0,008*	0,008*	0,008*	0,245			
50	0,016*	0,016*	0,009*	0,009*	0,008*		
100	0,009*	0,009*	0,009*	0,009*	0,008*	0,016*	

Note : * = *Significant difference*

Untuk mengetahui perbedaan dari setiap kelompok, digunakan uji Mann Whitney (Tabel 5.2). Pada hampir setiap kelompok terdapat perbedaan signifikan ($p < 0,005$) kemampuan proliferasi sel fibroblast BHK – 21.

PEMBAHASAN

Pengamatan uji toksistas ini merupakan indikator untuk mengetahui pengaruh konsentrasi dan paparan terhadap suatu substansi. Hasil penelitian pada konsentrasi 6,25% menunjukan toksisitas dengan

kemampuan proliferasi sel hanya sebesar 68,06%. Hal ini termasuk klasifikasi sedikit toksik¹¹. Konsentrasi tersebut menunjukkan bahwa banyaknya sel yang mati, yaitu sebesar 31,94% setelah perlakuan, dengan demikian konsentrasi yang aman dan tidak toksik sebagai medikamen kedokteran gigi adalah kurang dari 6,25%. Pada konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100% tanin diketahui menunjukan kemampuan proliferasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 6,25%. Kondisi ini menunjukkan adanya keadaan yang tidak umum terjadi. Pada umumnya semakin tinggi konsentrasi maka tingkat proliferasi sel menjadi semakin rendah yang dipaparkan dalam penelitian sebelumnya yaitu efek sitotoksik flavin dan EGCG pada sel RL-34 yang menyatakan bahwa seluruh polifenol akan menghasilkan sitotoksitas pada konsentrasi tinggi¹². Hal ini kemungkinan disebabkan oleh ekstrak tanin kulit manggis memiliki warna yang juga terhitung pada saat pembacaan. Semakin tinggi konsentrasi, maka warna yang terdapat dalam ekstrak manggis semakin memberikan pengaruh, yang ditunjukkan dengan semakin tingginya nilai absorbansi pada konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, 100% tanin dibandingkan dengan konsentrasi 6,25% tanin. Hal ini dapat mengakibatkan *false positive*. *False positive* merupakan hasil tes yang tidak benar karena tes gagal untuk mengenali kondisi atau temuan yang ada, dalam hal ini dikaitkan dengan suatu penyimpangan yang terjadi dimana sel dinyatakan hidup atau terjadi proliferasi sel padahal tidak sama sekali.

Tanin dapat memberikan hasil *falsepositive* dalam berbagai tes biologis karena tanin cenderung untuk membentuk kompleks nonselektif dengan protein (termasuk enzim, reseptor, dan protein struktural) melalui ikatan hidrogen multipoint. Air dan bahan organik yang mengandung tanin dapat menghambat enzim, seperti topoisomerase 1 dan 2 (T-1 dan T-2), *viral reverse transcriptase*, dan enzim lainnya, yang mengarah ke hasil menjadi *false positive*. . Tanin, sebagai zat pewarna akan menimbulkan warna cokelat atau kecokelatan .

Senyawa fenol memiliki aktivitas redoks potensial, termasuk reaktivitas dengan nitroblue tetrazolium¹³, sehingga dalam penelitian ini pada konsentrasi tinggi tidak dapat memberikan

hasil yang akurat dengan menggunakan MTT assay. Alternatif yang mungkin dapat digunakan adalah dengan *luciferase assay*. *Luciferin / luciferase assay* dapat mengukur jumlah ATP yang ditemukan dalam sel-sel hidup.

Tanin merupakan bahan aktif yang terdiri dari dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Kedua jenis tanin ini terdapat dalam tumbuhan, tetapi yang paling dominan terdapat dalam tanaman adalah tannin terkondensasi. Tanin menghambat *lipid peroxidation* yang diinduksi oleh *adenine 5'-diphosphate* (ADP) dan asam *ascorbic*. Tanin juga menghambat *lipid peroxidation* yang diinduksi oleh ADP dan NADPH keduanya pada mitokondria⁶. *Tanin* dapat menstimulasi *Transforming growth factor β* (TGF- β)¹⁴ melalui aktivitas antioksidan yang mampu memblokir inisiasi dari susunan radikal bebas sehingga TGF- β menstimulasi proliferasi fibroblas. TGF- β juga dapat melindungi jaringan sehat dan menstimulasi produksi kolagen¹⁵. Selain itu, efek antioksidan dari senyawa tanin adalah sebagai chelator transisi ion logam untuk mencegah terjadinya oksidatif DNA dengan cara menetralkan kelebihan ion logam, menekan pembentukan radikal hidroksil dan menstabilkan aktivitas *prooxidative*¹⁶. Salah satu turunan dari tanin adalah *proanthocyanidins (condensed tannin)* memiliki afinitas yang kuat dengan enzim proteolitik seperti *elastase, xanthine oxydase, β glucuronidase, collagenase, dan hyaluronidase*, yang terlibat dalam penghancuran komponen matriks. Hal ini menunjukkan bahwa *proanthocyanidins* berinteraksi dengan membran dinding sel melalui ikatan energi yang lemah dari ikatan jenis hidrogen dan interaksi hidrofobik. Dalam hal tersebut, *proanthocyanidins* menetralkan enzim yang menghentikan degradasi matriks ekstraseluler dengan menetralkan kelebihan MMPs (*Matirx Metallo Protease*). Adanya MMP -2, -3, -9 dapat merusak matriks sel sehingga dapat menghambat perkembangan sel. Penetralkan MMPs membantu menciptakan lingkungan yang menguntungkan bagi pertumbuhan sel fibroblast. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan aktivitas proliferasi sel BHK – 21.

Penurunan proliferasi sel menunjukkan adanya kematian sel, hal tersebut karena

aktivitas tanin yang bersifat *astringent* sehingga dapat menyebabkan membran mukosa mengikat lebih kuat dan menjadi kurang permeabel. *Tanin* bila diberikan pada dosis yang tinggi akan menyebabkan iritasi pada membran mukosa tersebut⁹. *Tanin* mempunyai afinitas tinggi terhadap protein pada mukosa dan sel epitel mukosa. Hal tersebut disebabkan *Tanin* merupakan senyawa golongan fenolik, memiliki molekul yang dapat membentuk kompleks dengan protein sehingga mampu menginaktivasi enzim dan protein yang mengakibatkan gangguan pada sitoplasma¹⁷.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tanin dari ekstrak kulit manggis menunjukkan sifat sedikit toksik pada konsentrasi 6,25% dan tidak toksik pada konsentrasi kurang dari 6,25% yang setara dengan 2,20% isolasi tanin dari ekstrak kulit manggis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Walton RE, Torabinejad, M. *Prinsip dan Praktik Ilmu Endodonsia*. Alih bahasa. Narlan, S. edisi ke-3. Jakarta: EGC, 2008: 244, 317, 318, 324
2. Shahani M N, Subba Reddy V V. Comparison of Antimicrobial Substantivity of Root Canal Irrigants in Instrumented Root Canals up to 72 h: An in vitro study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics & Preventive Dentistry*; Jan-Mar 2011, Vol. 29 Issue 1, India: Bharati Vidhyapeeth University, Dental College and Hospital.
3. Kaomongkolgit, Ruchadaporn, Jamdee, Kusuma, Pumklin, Jiittima & Pavasant, Prasit. Laboratory evaluation of the antibacterial and cytotoxic effect of alpha mangostin when used as a root canal irrigant. *Indian Journal of Dentistry* 2013, 4: 12-17
4. Moongkarndi, P, Kosem, N, Kaslungka, N, Luanratana, O, Pongpan, N, Neungton, N. Antiproliferation, antioxidation and induction of apoptosis by *Garcinia mangostana* (mangosteen) on SKBR3 human breast cancer cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 90, 161- 166.

5. Shan, T, Ma, Q, Guo, K, Liu, J, Li, W, Wang, F. *Xanthenes from Mangosteen extracts as natural chemopreventive agent: Potential anticancer drugs*. National Institut of Health ; 2011.
6. Hayyu N, Endah A dan Djamhari M. Uji sitotoksisitas ekstrak kulit *Garcinia mangostana* Linn terhadap sel fibroblas gingiva manusia. *Oral Medicine Dental Journal* 2013, 4(1):10-6
7. Okuda, T, Ito, H. *Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins*. *Molecules*. 2011; 16:2191-2217.
8. Bansa, A, Adeyemo, S.O. 2007. Evaluation of Antibacterial Properties of Tannins Isolated from *Dichrostachys cinerea*. *African Journal of Biotechnology* 2007; vol.6 (15), pp.1785 - 1787
9. Vermerrish W & Ralph Nicolson. *Phenolic Compound Biochemistry*. Netherlands: Springer; 2006. pp:24-25
10. Freshney, RI. *Culture of Animal Cell; A manual of Basic Technique*. 4th Edition. New York: Wiley Liss Inc; 2000. pp:89
11. Heravi, F., Ramezani, M., Poosti, M., Hosseini, M., Shajiei, A., dan Ahrari, F. In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium – dioxide Nano – particles. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 2013; 7(4), 192-198.
12. Feng Q, Torii Y, Uchida K, Nakamura Y, Hara Y and Osawa T. *Black Tea Polyphenols, Theaflavins, Prevent Cellular DNA Damage by Inhibiting Oxidative Stress and Suppressing Cytochrome P450 1A1 in Cell Cultures*. *J. Agric. Food Chem* 2002; 50(1):213-220
13. Wisman, K N., Perkins A A., Jeffers M D., Hagerman A E. Accurate Assessment of the Bioactivities of Redox-Active Polyphenolics in Cell Culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56, 7831–7837.
14. Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, Iwakura I, Satoh K, Ito H, Hatano T and Yoshida T. *Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines--a possible mechanism*. *Phytomedicine* 2000; 7(1):39-47
15. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. *Growth factor and Cytokines in wound healing, wound repair and regeneration*. *Wound Repair Regen* 2008; 16(5):585-601
16. Catherine, Clinton. 2009. Plant tannins: A Novel Approach to The Treatment of Ulcerative Colitis. *Natural Medicine Journal* 2009; 1(3), 1-4
17. Murray, RK, Granner, DK, Mayes, PA, Rodwell, VW. *Biokimia Harper*, Edisi 25. Jakarta : EGC; 2003.