

UJI EFEK ANTIINFLAMASI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ALFAFA (*Medicago sativa*) PADA TIKUS PUTIH JANTAN YANG DIINDUKSI KARAGENIN

Lia Kusmita*, Wahyuning Setyani, Ika Puspitaningrum
STIFAR “Yayasan Pharmasi” Semarang
*Email: lia_kusmita@yahoo.com

ABSTRAK

*Inflamasi (radang) adalah reaksi setempat dari jaringan hidup atau sel terhadap suatu rangsang atau injury (cedera atau jejas). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi fraksi etil asetat ekstrak herba alfafa (*Medicago sativa*) terhadap salah satu parameter inflamasi yaitu pembengkakan pada kaki tikus dengan induksi karagenin 1%. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui dosis efektif dari fraksi etil asetat ekstrak herba alfafa sebagai antiinflamasi.*

Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus jantan galur Wistar sebanyak 25 ekor dibagi 5 kelompok. Kelompok I (kontrol negatif) Na CMC 0,5%, kelompok II (kontrol positif) natrium diklofenak 6,3 mg/kgBB tikus, serta kelompok III, IV dan V suspensi fraksi etil asetat ekstrak alfafa 6,3; 12,6 dan 25,2 mg/kgBB tikus. Inflamasi (radang) pada tikus dengan cara diinduksi karagenin 1% sebanyak 0,10 ml. Volume edema setiap jam diketahui dari selisih volume telapak kaki pada jam-jam tertentu dengan volume kaki normal. Nilai AUC volume edema dihitung dengan metode trapezoid tiap satu jam dan dihitung % daya anti inflamasi (DAI). Nilai AUC volume edema yang diperoleh dianalisa statistik dengan uji Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney menggunakan SPSS release 16.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi etil asetat ekstrak alfafa dapat menurunkan volume edema kaki tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi karagenin dengan dosis efektif sebesar 6,3 mg/ kgBB tikus dan daya antiinflamasi sebesar 20,95%.

Kata kunci: alfafa, antiinflamasi, fraksi etil asetat

1. PENDAHULUAN

Radang tenggorokan merupakan penyakit yang banyak diderita oleh masyarakat sekarang ini. Salah satu faktor penyebab terjadinya radang tenggorokan adalah makanan dan minuman yang dikonsumsi. Kebanyakan masyarakat Indonesia menyukai makanan yang pedas dan gorengan penyebab utama timbulnya radang. Untuk mengatasi masalah tersebut diperlukan suatu senyawa antiinflamasi. Tanaman yang dapat berfungsi sebagai senyawa antiinflamasi adalah alfafa (*Medicago sativa*) (Hong dkk., 2009). Alfafa dikenal sebagai “bapak makanan” di dunia karena mempunyai kandungan gizi yang tinggi.

Alfafa merupakan tumbuhan yang berasal dari daerah subtropis, tapi sekarang ini alfafa dapat juga ditumbuhkan di daerah tropis yang disebut alfafa (alfafa tropis). Secara kualitas dan kuantitas alfafa tropis mempunyai keunggulan dibandingkan dengan alfafa subtropis. Keunggulan rumput alfafa yang lain adalah dapat digunakan sebagai makanan kesehatan bagi manusia (Widiasmadi, 2011). Alfafa mempunyai kandungan protein yang cukup tinggi, selain itu juga alfafa mempunyai kandungan senyawa aktif diantaranya klorofil, alkaloid (Bo-Ping dkk., 2010), coumestrol (Hong dkk., 2011), saponin (Colodny, 2001), dan lain-lain. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Hong, dkk (2011) senyawa aktif dari herba alfafa banyak ditemukan dalam fraksi etil asetat. Hidayati dkk., telah meneliti uji sitotoksitas fraksi etil asetat ekstrak etanol herba alfafa terhadap sel kanker payudara dan leher rahim.

Pemanfaatan alfafa untuk pengobatan di Indonesia masih belum banyak, apalagi dikemas dalam suatu sediaan farmasi. Suatu sediaan farmasi harus sesuai dengan keinginan masyarakat agar dapat diterima dengan baik. Bentuk sediaan yang dapat diterima untuk mengobati radang tenggorokan adalah tablet hisap. Berdasarkan latar belakang diatas diperlukan penelitian tentang manfaat herba alfafa dalam fraksi etil asetat yang akan dibuat sediaan tablet hisap.

2. METODOLOGI

2.a. Bahan

Bahan utama adalah simplisia Alfafa (*Medicago sativa*) tropis yang diperoleh dari perkebunan Selopass Boyolali, larutan etanol 70%, KLT adalah Lempeng silika Gel GF 254 nm, ammonia, AlCl₃, anisaldehyd, asam sulfat, butanol, asam asetat, kloroform, methanol, natrium diklofenak, karagenin, tikus putih jantan galur wistar, metinol, mentol, aspartame, gelatin, FDC green, talk, Mg stearat, natrium benzoate.

2.b. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, seperangkat alat gelas, waterbath, batang pengaduk, kertas saring, cawan poselin, rotary evaporator, pipa kapiler, chamber, papan penyemprot, lampu UV, botol semprot, Spektrovotometer UV-VIS timbangan hewan uji, spuit injeksi, sonde tikus, pletismometer, stopwatch, almari pengering, mesin cetak tablet single punch, corong alir

2.c. Penyiapan Simplisia

Sampel herba alfafa yang berasal dari Boyolali ditimbang dan dilakukan sortasi basah. Sortasi basah bertujuan memisahkan bagian tanaman yang digunakan dengan bagian tanaman lain atau bagian tanaman yang tidak digunakan. Selanjutnya, ditimbang kembali dan diperoleh persen pengotor. Herba alfafa yang telah disortasi, dicuci bersih dan dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup akin hitam agar tidak terkena langsung sinar matahari. Setelah kering, simplisia disortasi kering dengan ditimbang kembali. Simplisia diserbukkan dan diayak dengan ayakan no.30/40. Simplisia yang digunakan adalah simplisia yang lolos pada ayakan no.30 dan tidak lolos pada ayakan no.40. serbuk simplisia selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi.

2.d. Ekstraksi

Ditimbang 200 gram serbuk herba alfafa, dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% selama 5 hari dan diaduk dengan bantuan shaker rotator selama 2 jam kemudian didiamkan selama 24 jam. Dilakukan penyarian setelah 24 jam sehingga terpisah antara filtrate (ekstrak etanol) dengan residu. Residu yang didapat ditambah lagi dengan 500 ml etanol 96% dan dilakukan proses yang sama selama 5 hari. Semua filtrat dicampur dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

2.e. Fraksinasi

Ekstrak kental herba alfafa yang diperoleh dilarutkan ke dalam campuran air dan etanol dengan perbandingan 9:1. Selanjutnya, difraksinasi dengan menggunakan corong pisah berturut-turut dengan pelarut n-heksan, kloroform, dietil eter dan etil asetat. Proses ini dilakukan hingga cairan jernih. Jumlah pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sebanding dengan jumlah air-etanol yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (perbandingan 1:1). Fraksi etil asetat ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

2.f. Uji Antiinflamasi

Dua puluh lima ekor tikus dibagi dalam lima kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor tikus. Sebelum tikus mendapatkan perlakuan sediaan uji, terlebih dahulu tikus diadaptasikan dengan lingkungan penelitian, kemudian dipuaskan 18 jam dengan tetap diberi minum sebelum diberi perlakuan sediaan uji.

Proses pengujian aktivitas antiinflamasi sebagai berikut :

1. Tikus masing-masing kelompok ditandai telapak kaki kanan belakang sebatas mata kaki dengan menggunakan spidol permanen.
2. Masing-masing kelompok, diukur volume normal kaki kanan belakang (V_n) dengan mencelupkannya ke dalam cairan raksa sampai batas tanda pada alat plestismometer.
3. Semua hewan uji diberi perlakuan secara oral sehari sekali sesuai kelompoknya
Kelompok I : natrium diklofenak 6,3 mg/kg BB tikus (kontrol positif)
Kelompok II : CMC Na 0,5% (kontrol negatif)
Kelompok III : fraksi etil asetat ekstrak Alfafa 6,3 mg/kgBB tikus
Kelompok IV : fraksi etil asetat ekstrak Alfafa 12,6 mg/kgBB tikus
Kelompok V : fraksi etil asetat ekstrak Alfafa 25,2 mg/kgBB tikus
4. Tiga puluh menit setelah perlakuan, diberikan injeksi karagenin 1% sebanyak 0,10 ml secara subplantar pada kaki kanan belakang tikus yang diukur volumenya tadi.
5. Masing-masing kelompok, diukur volume kaki kanan belakang (V_{t_0}) dengan mencelupkannya ke dalam cairan raksa sampai batas tanda pada alat plestismometer.
6. Selanjutnya setiap $\frac{1}{2}$ jam, diukur volume kaki kanan belakang dengan cara mencelupkannya ke dalam cairan raksa sampai batas tanda pada alat plestismometer. Pengukuran dilakukan selama 3 jam. Volume kaki dibaca pada pipet ukur 1 ml dengan 1 skala pada pipet ukur sebesar 0,1 ml.
7. Volume edema pada setiap jam diketahui dari selisih volume telapak kaki pada jam-jam tertentu ($V_{t_0}, V_{t_1}, V_{t_2}, V_{t_3}, V_{t_4}, V_{t_5}$) dengan volume telapak kaki normal (V_n)

2.g. Analisa Data

Analisa data dilakukan dengan menghitung selisih antar volume kaki tikus setelah diinjeksi dengan karagenin 1% dengan volume kaki tikus normal (awal).

$$V_u = V_t - V_n$$

Keterangan :

V_u : Volume edema

V_t : Volume kaki tikus pada waktu ke-t

V_n : Volume kaki tikus normal (sebelum diinjeksi karagenin 1%)

Untuk mengetahui efek antiinflamasi, dilakukan perhitungan dalam persen (%) efek antiinflamasi dengan cara membandingkan volume edema dengan volume kaki normal pada hewan uji, dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Volume Udema (P)} = \frac{V_u}{V_n} \times 100\%$$

Karena pada tiap hewan uji mempunyai pola edema yang tidak sama di dalam kelompok maupun antar kelompok, maka perhitungan DAI dilakukan berdasarkan luas daerah di bawah kurva (AUC). Nilai AUC volume edema dihitung dengan metode trapezoid tiap satu jam. Data yang digunakan adalah persen volume edema dan waktu pengukuran.

$$(AUC)_{t_n - t_{n-1}} = \frac{P_n + P_{n-1}}{2} (t_n - t_{n-1})$$

Keterangan :

P_n : persentase volume edema jam ke-n

P_{n-1} : persentase volume edema 1/2 jam sebelumnya

t_n : waktu ke-n

t_{n-1} : waktu 1/2 jam sebelumnya

Sehingga nilai DAI dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ DAI} = \frac{\text{AUC}_k - \text{AUC}_u}{\text{AUC}_k} \times 100\%$$

Keterangan :

AUC_k : rata-rata AUC volume edema kaki tikus yang hanya diberikan karagenin 1% subplantar saja (kontrol negatif)

AUC_u : rata-rata AUC volume edema kaki tikus yang diberi perlakuan obat

Daya Anti Inflamasi (DAI) menunjukkan kemampuan obat dalam menurunkan volume edema. Semakin besar nilai DAI maka semakin bagus efek antiinflamasinya.

Data yang diperoleh dianalisis dengan Kolmogorov-Smirnov untuk melihat distribusi data. Karena data tidak berdistribusi normal maka uji statistik yang digunakan adalah uji statistik non-parametrik, yaitu uji *Kruskal-Wallis* dengan taraf kepercayaan 95%, dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiinflamasi dan dosis efektif fraksi etil asetat ekstrak Alfafa (*Medicago sativa*) pada tikus putih jantan yang diinduksi karagenin.

Alfafa yang digunakan diperoleh dari daerah Tatar Boyolali Jawa Tengah. Selanjutnya alfafa dideterminasi untuk memastikan bahwa sampel yang diperoleh benar-benar alfafa seperti yang dikehendaki. Determinasi dilakukan di Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Hasil yang diperoleh alfafa memiliki nama latin *Medicago sativa*.

Alfafa yang diperoleh diolah menjadi simplisia dengan langkah awal dilakukan sortasi basah. Sortasi basah bertujuan memisahkan bagian tanaman yang digunakan dengan bagian tanaman lain atau bagian tanaman yang tidak digunakan. Herba alfafa yang telah disortasi, dicuci bersih dan dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup akin hitam agar tidak terkena langsung sinar matahari. Setelah kering, simplisia disortasi kering dengan ditimbang kembali. Simplisia diserbukkan dan diayak dengan ayakan no.30/40. Simplisia yang digunakan adalah simplisia yang lolos pada ayakan no.30 dan tidak lolos pada ayakan no.40. Serbuk simplisia selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 5 hari. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Ekstrak kental yang diperoleh difraksinasi dengan menggunakan corong pisah berturut-turut dengan pelarut n-heksan, kloroform, dietil eter dan etil asetat. Proses ini dilakukan hingga cairan jernih. Jumlah pelarut yang digunakan untuk fraksinasi sebanding dengan jumlah air-etanol yang ditambahkan ke dalam ekstrak etanol (perbandingan 1:1). Fraksi etil asetat ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh fraksi etil asetat kental.

Uji pendahuluan dimulai dengan melakukan skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa-senyawa yang ada di dalam fraksi etil asetat ekstrak Alfafa yang diduga sebagai antiinflamasi. Skrining fitokimia meliputi uji fenolik, alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan

triterpenoid. Apabila hasilnya positif maka dilanjutkan uji penegasan menggunakan KLT untuk memastikan benar terdapat zat yang positif di uji skrining fitokimia. Hasil yang diperoleh baik skrining fitokimia maupun uji penegasan menunjukkan fraksi etil asetat ekstrak alfafa mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, dan triterpenoid/steroid.

Selanjutnya perlakuan senyawa uji pada tikus putih jantan galur Wistar 2-3 bulan untuk melihat efek antiinflamasi dari fraksi etil asetat Alfafa. Parameter inflamasi yang diamati adalah edema pada kaki tikus dengan pemberian karagenin 1% secara subplantar. Karagenin tidak menimbulkan kerusakan jaringan lainnya dan tidak menimbulkan bekas luka, serta memberikan respon yang lebih peka terhadap obat antiinflamasi. Waktu laten karagenin dimulai 1 jam dan pembentukan edema maksimal terjadi 3 jam setelah pemberian karagenin (Vogel, 2002; Gryglewski, 1976). Data yang diamati adalah persentase volume edema, nilai *Area Under Curve* (AUC) yang menggambarkan besarnya edema, serta persentase daya antiinflamasi (% DAI). Hasil pengamatan ini dapat dilihat pada tabel I.

Tabel I. Rata-rata % Volume edema, AUC Total, dan % DAI berbagai kelompok perlakuan

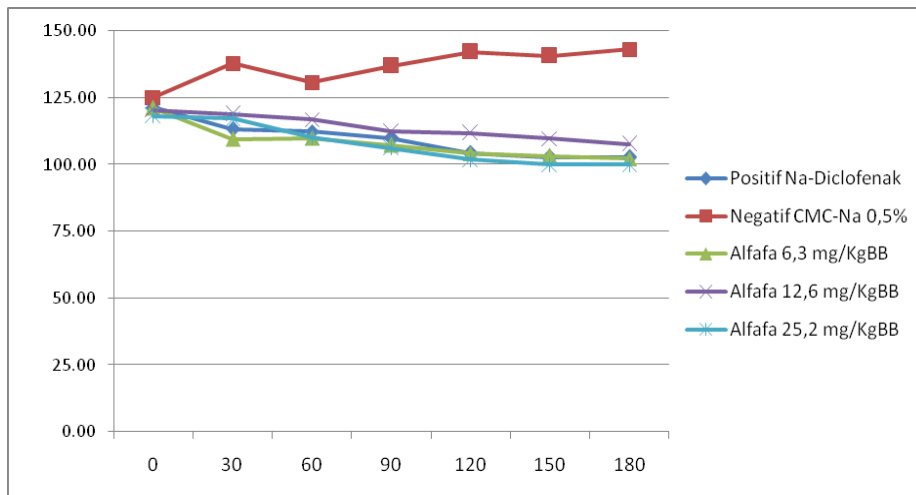
Kelompok	% Volume Udema							AUC Total (ml.jam)	% DAI
	0 menit	30 menit	60 menit	90 menit	120 menit	150 menit	180 menit		
Positif Na-Diclofenak	121,33	113,27	112,32	109,95	104,27	102,84	102,84	69,08 ^a	20,4
Negatif CMC-Na 0,5%	125,12	137,91	130,81	136,97	142,18	140,76	143,13	86,83 ^b	0
Alfafa 6,3 mg/KgBB	121,27	109,50	109,95	107,24	104,07	103,17	102,26	68,63 ^a	21
Alfafa 12,6 mg/KgBB	120,51	118,97	116,92	112,31	111,79	109,74	107,69	66,63 ^a	23,3
Alfafa 25,2 mg/KgBB	118,27	117,31	110,10	106,25	101,92	100,00	100,00	67,04 ^a	22,8

Keterangan:

a: berbeda bermakna ($p < 0,05$) terhadap kelompok negatif dengan uji Mann-Whitney

b: berbeda bermakna ($p < 0,05$) terhadap kelompok positif dengan uji Mann-Whitney

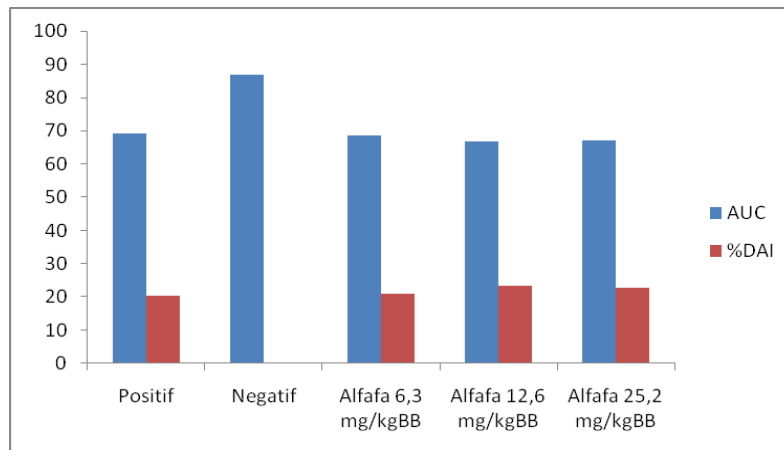
Berdasarkan tabel I, puncak terjadinya edema yang disebabkan oleh karagenin terjadi pada menit ke 30. Selanjutnya dengan adanya pemberian Alfafa baik dosis 6,3, 12,6, dan 25,2 mg/kgBB serta natrium diklofenak, persentase volume edema semakin turun. Hal ini menunjukkan bahwa Alfafa dapat menurunkan volume edema atau sebagai antiinflamasi. Sedangkan kelompok kontrol negatif dengan pemberian pembawa fraksi etil asetat yaitu CMC Na 0,5% % volume edema tetap bahkan menaik. Grafik mengenai gambaran persentase volume edema semua kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Grafik hubungan % volume edema terhadap waktu berbagai kelompok perlakuan

Selanjutnya % volume edema digunakan untuk menghitung nilai AUC. AUC menggambarkan besarnya radang yang terjadi. Setelah itu, % DAI juga dihitung untuk menggambarkan persentase daya antiinflamasi. Nilai AUC berbanding terbalik dengan %DAI. Semakin kecil nilai AUC berarti besarnya radang semakin berkurang sehingga semakin besar persentase daya antiinflamasi. Berdasarkan tabel I, nilai AUC total kelompok kontrol negatif paling besar dibandingkan kelompok lain. Kelompok kontrol positif Na Diklofenak mempunyai nilai AUC lebih besar daripada kelompok Alfafa semua dosis. Hal ini juga ditunjukkan dari % DAI Alfafa lebih besar daripada obat Na Diklofenak. Semakin tinggi dosis Alfafa semakin tinggi pula % DAI. Hal ini membuktikan bahwa Alfafa dapat berefek mengurangi edema yang merupakan salah satu tanda inflamasi atau disebut juga sebagai antiinflamasi. Gambaran nilai AUC total dan % DAI semua kelompok perlakuan dapat dilihat pada gambar 2.

Uji statistika dengan SPSS 16.00 juga dilakukan untuk mempertegas efek antiinflamasi Alfafa. Hasil yang diperoleh terdapat perbedaan signifikan nilai AUC antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok Alfafa semua dosis. Hal ini membuktikan bahwa fraksi etil asetat herba Alfafa dapat berefek antiinflamasi. Selain itu hasil statistika diperoleh ada perbedaan tidak signifikan nilai AUC antara kelompok Na Diklofenak dengan kelompok Alfafa semua dosis. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai efek antiinflamasi yang sebanding dengan Na Diklofenak. Berdasarkan hasil uji statistika, dosis efektif fraksi etil asetat Alfafa sebesar 6,3 mg/kgBB.



Gambar 2. Diagram nilai AUC total (ml.jam) dan % DAI semua kelompok perlakuan

Fraksi etil asetat Alfafa dapat berefek antiinflamasi diduga disebabkan oleh metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya, yaitu flavonoid, saponin dan steroid. Beberapa flavonoid berperan dalam penghambatan lipooksigenase sedangkan flavonoid lainnya berperan dalam menghambat sintesis prostaglandin (Robinson, 1995). Flavonoid juga mempunyai pengaruh terhadap metabolisme kolagen dengan beberapa cara antara lain dengan berikatan silang dengan serat kolagen sehingga ikatan silang kolagen menjadi kuat, dan mampu menghentikan kerusakan struktur kolagen yang diakibatkan adanya enzim dari sel darah putih proses ini timbul selama peradangan (Wirakusumah, 2002).

Efek flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung juga mendukung efek antiinflamasi flavonoid. Adanya radikal bebas dapat menarik berbagai mediator inflamasi (Halliwell, 1995 dalam Nijveldt et al., 2001). Korkina (1997) dalam Nijveldt et al., (2001) menambahkan bahwa flavonoid dapat menstabilkan Reactive Oxygen Species (ROS) dengan bereaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga radikal menjadi inaktif.

Saponin sudah banyak dilaporkan dapat berefek sebagai antiinflamasi, namun mekanismenya belum diketahui secara jelas. Saponin terdiri dari steroid atau gugus triterpen (aglikon) yang mempunyai aksi seperti detergen. Mekanisme antiinflamasi yang paling mungkin adalah diduga saponin mampu berinteraksi dengan banyak membran lipid (Nutritional Therapeutics, 2003) seperti fosfolipid yang merupakan prekursor prostaglandin dan mediator-mediator inflamasi lainnya.

Steroid dalam tubuh dapat menghambat enzim phospholipase A2 yaitu enzim yang bertanggungjawab atas pembebasan asam arakhidonat yang kemudian dimetabolisme oleh enzim siklooksigenase dan lipooksigenase yang kemudian akan membebaskan mediator-mediator radang (Katzung, 2002).

4. KESIMPULAN

Fraksi etil asetat ekstrak Alfafa (*Medicago sativa*) dapat berefek antiinflamasi pada tikus putih jantan yang diinduksi karagenin dengan dosis efektif sebesar 6,3 mg/kgBB.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Diknas Pendidikan Provinsi Jawa Tengah atas dana penelitian melalui Hibah Penelitian Dosen Muda tahun anggaran 2014.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Bo-ping, W., Yong-mei, Z., Zhi-Zhong, C., and Yong-zhil, T., 2010, Study on Extraction of Flavonoids in Alfalfa Assisted With Ultrasonic Wave, *Acta Agrestia Sinica*, **6**
- Colodny LR, Montgomery A, Houston M., 2001, The role of esterin processed alfalfa saponins in reducing cholesterol, *J Am Nutraceutical Assoc.* 3.
- Hong YH, Huang CJ, Wang SC, Lin BF. 2009. Ethyl acetate extracts of alfalfa (*Medicago sativa* L.) sprouts inhibit lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biomedical Science.* 16:64. doi:10.1186/1423-0127-16-64
- Hong, Y., Wang, S., Hsu, C., Lin, B., Kuo, Y., and Huan, C., 2011, Phytoestrogenic Compounds in Alfalfa Sprout (*Medicago Sativa*) Beyond Coumestrol, *J. Agri. Food Chem*, **59**, 131-137.
- Katzung, B.G. 2002. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Jakarta: Salemba Medika
- Nijveldt, R. J., E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren, P.A.M. van Leeuwen. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical and Nutrition* 74: 418-425.
- Nutritional Therapeutics. 2003. NT Factor: Phosphoglycolipids-High Energy Potential. www.propax.com/FAQ/soy_high_energy.html [2 Desember 2005].
- Robbins SL, Kumar V. 1995. *Buku Ajar Patologi I*. Terjemahan Staf Pengajar Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran UNAIR , cetakan 2. Jakarta : EGC.
- Widiasmadi, N., 2011. *Mengenal Alfafa Tropika*. <http://alfatrop.blogspot.com/>
- Wirakusumah, E.S. 2002. *Buah dan sayur untuk terapu*. Jakarta : Penebar Swadaya