

# **FRAKSINASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA AKTIF DARI BANGLE (*ZINGIBER CASSUMUNAR ROXB.*) SEBAGAI AKTIVATOR ENZIM KOLESTEROL OKSIDASE**

**Dyah Iswantini, Dewi Nurenda dan Purwantiningsih Sugita**  
Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Institut Pertanian Bogor.

## **ABSTRAK**

Bangle adalah salah satu rimpang yang biasanya digunakan sebagai campuran obat tradisional sebagai pelangsing dan penurun kolesterol. Khasiat ganda sebagai pelangsing dan penurun kolesterol (ekstrak kasar steroid) telah diperoleh pada daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk). Kajian bangle yang berhubungan dengan kolesterol belum pernah dilakukan. Kolesterol oksidase yang berfungsi mengoksidasi kolesterol sudah banyak dikenal sebagai enzim yang digunakan dalam biosensor kolesterol dalam darah. Sebagai kajian yang dapat dijadikan dasar biosensor kolesterol, maka dilakukan penelitian mengenai potensi steroid bangle dalam meningkatkan aktivitas enzim kolesterol oksidase.

Dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan senyawa steroid, fraksinasi dan karakterisasi steroid rimpang bangle, dan pengujian potensi fraksi aktif steroid rimpang bangle terhadap aktivitas enzim kolesterol oksidase dengan menggunakan kit kolesterol Randox.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen ekstrak etanol sebesar 11,36% dan rendemen ekstrak kloroform (ekstrak diduga steroid) sebesar 6,42%. Eluen terbaik yang digunakan untuk pemisahan steroid rimpang bangle adalah kloroform-heksana (9:1). Fraksinasi steroid rimpang bangle menghasilkan 14 fraksi. Lima fraksi diantaranya positif terhadap steroid, yaitu fraksi 3, 4, 5, 6, dan 8. Uji terhadap aktivitas enzim kolesterol oksidase menunjukkan fraksi 8 menyebabkan peningkatan aktivitas enzim (30,37%), sedangkan empat fraksi lainnya dan ekstrak kasar kloroform menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Penurunan aktivitas enzim terbesar ditunjukkan oleh fraksi 4 (-24,15%). Fraksi 4 dan 8 diidentifikasi menggunakan spektroskopi ultraviolet dan inframerah. Fraksi 4 menunjukkan  $\lambda$  maksimum 272 nm, sedangkan fraksi 8 menunjukkan  $\lambda$  maksimum 268 nm. Fraksi 4 dan 8 diduga mengandung gugus fungsi O-H, C-O, C=C, dan C-H.

**Kata kunci:** Bangle, *Zingiber cassumunar* Roxb., kolesterol oksidase, aktivator dan steroid.

## **PENDAHULUAN**

Tanaman bangle merupakan salah satu jenis tanaman obat yang tumbuh di daerah Asia tropika, dari India sampai Indonesia (Wijayakusuma *et al.* 1977). Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb) menurut Wijayakusuma (2002) dapat digunakan sebagai pelangsing. Penelitian terhadap rimpang bangle juga telah dilakukan oleh Darusman *et al.* pada tahun 2001, yang melakukan pengkajian terhadap senyawa golongan flavonoid asal tanaman bangle sebagai senyawa peluruh lemak melalui aktivitas lipase. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa aktivitas enzim hidrolitik tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak metanol 80% (penelitian dilakukan terhadap 3 ekstrak; ekstrak metanol 80%, etanol 30%, dan air bebas ion), yaitu sebesar 43,43  $\mu\text{mol/g}/\text{menit}$ . Febriany (2004)

melakukan penelitian potensi bangle sebagai pelangsing dan menyatakan bahwa ekstrak tanin bangle pada konsentrasi 300 ppm merupakan ekstrak yang memiliki potensi paling besar dalam meningkatkan aktivitas enzim lipase. Ekstrak bangle memiliki kecenderungan meningkatkan aktivitas enzim lipase juga menurunkan aktivitas enzim tersebut, tergantung jenis ekstraknya. Mekanisme pelangsing Bangle dengan pendekatan aktivitas enzim Lipase sangat ditentukan oleh konsentrasi ekstrak dan jenis ekstrak, sehingga ada yang bersifat aktivator juga inhibitor, sedangkan faktor sinergis dan antagonis ekstrak gabungan tidak mudah untuk diketahui (Dyah Iswanti, *et al.*, 2005). Kadarisman (2000) berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa kimia bioaktif dari rimpang bangle. Senyawa tersebut diduga sebagai (E)-4-(3',4'-dimetoksifenil)But-3-en-1-il-asetat dan (E)-4-(3',4'-dimetoksifenil)But-3-en-1-ol. Kadarisman mengisolasi senyawa ini dari fraksi etil asetat ekstrak metanol. Pada tahun 1994, Masuda & Jitoe juga mengisolasi senyawa antioksidatif dan antiinflamatori dari rimpang bangle. Senyawa tersebut dilaporkan sebagai senyawa kompleks kurkumin dari rimpang bangle yaitu kasumunin A, kasumunin B, dan kasumunin C.

Khasiat ganda sebagai pelangsing dan penurun kolesterol telah diperoleh pada daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) (Darusman *et al.* 2003). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak teraktif daun jati belanda sebagai penurun kolesterol adalah ekstrak etanol.

Kajian bangle yang berhubungan dengan kolesterol belum pernah dilakukan. Kolesterol oksidase yang berfungsi mengoksidasi kolesterol sudah banyak dikenal sebagai enzim yang digunakan dalam biosensor kolesterol dalam darah. Sebagai kajian yang dapat dijadikan dasar biosensor kolesterol, maka dilakukan penelitian mengenai potensi steroid bangle dari ekstrak etanol dalam meningkatkan aktivitas enzim kolesterol oksidase.

Penentuan aktivitas kolesterol oksidase selain menggunakan enzim kolesterol murni dapat juga menggunakan kit komersial, salah satunya adalah kit Randox. Selain enzim kolesterol oksidase, kit ini mengandung 4-aminopiridin, kolesterol esterase, fenol, peroksidase, dan buffer pH 6,8.



Gambar 1. Reaksi kolesterol yang dikatalisis kolesterol oksidase.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dibagi dalam dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penelitian pendahuluan adalah persiapan contoh dan pembuatan ekstrak kasar etanol yang dipartisi oleh kloroform untuk mendapatkan steroid. Penelitian utama adalah melakukan fraksinasi dan karakterisasi ekstrak diduga steroid (fs) rimpang bangle, dan pengujian potensi fs rimpang bangle terhadap aktivitas enzim kolesterol oksidase dengan menggunakan kit kolesterol Randox secara spektrofotometri.

### Persiapan Contoh

Persiapan contoh meliputi beberapa kegiatan, yaitu pengumpulan bahan baku, sortasi basah, perajangan, dan pengeringan. Bahan baku diambil dari Unit Pelaksana Teknis Fungsional, Sindang Barang, Darmaga, Bogor.

### Ekstraksi Rimpang Bangle

Rimpang Bangle dibersihkan dari kotoran yang melekat lalu dipotong kecil-kecil, kemudian dikering-udarkan. Setelah kering, bahan di-defatty dengan heksana. Rimpang Bangle kemudian diekstraksi dengan cara maserasi dengan etanol hingga larutan menjadi jernih, lalu disaring, dan diuapkan pelarutnya dengan rotary evaporator hingga diperoleh residu kering ekstrak etanol.

Ekstrak etanol yang telah didapatkan kemudian dipartisi dengan kloroform menggunakan corong pisah. Fase kloroform kemudian dipisahkan, lalu diuapkan pelarutnya dengan rotary evaporator hingga diperoleh residu kering ekstrak kloroform.

### Fraksinasi dan Karakterisasi Steroid Rimpang Bangle

Sebelum melakukan pemisahan terhadap fs rimpang bangle, dilakukan pencarian pelarut terbaik terlebih dahulu dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fs bangle dipisahkan dengan menggunakan kromatografi kolom. Hasil fraksi kromatografi kolom yang memberikan hasil positif terhadap uji Liebermann-Burchard kemudian diujikan terhadap aktivitas enzim kolesterol oksidase. Fraksi yang paling aktif kemudian dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS dan IR.

### Uji *In Vitro* Fraksi Aktif Steroid Terhadap Aktivitas Kolesterol Oksidase

Metode pengukuran dilakukan dengan menggunakan kit kolesterol Randox. Sebanyak 5  $\mu$ l substrat kolesterol dan 5  $\mu$ l fraksi aktif steroid dimasukkan ke dalam vial ependorf, kemudian ditambahkan 1 ml kit kolesterol, dan ditiadakan selama 10 menit pada suhu kamar hingga terbentuk warna merah muda. Setelah itu larutan diukur pada  $\lambda$  546 nm. Pengukuran yang sama juga dilakukan pada ekstrak kloroform rimpang bangle. Blanko dibuat dengan konsentrasi substrat kolesterol 0,00% dengan perlakuan sama. Kontrol negatif dibuat dengan substrat 2500mg/l, tanpa ekstrak, dan dengan perlakuan yang sama.

$$[\text{Kolesterol}] (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta A \text{ Contoh} \times C \text{ Standar}}{\Delta A \text{ Standar}}$$

$$\text{Aktivitas (unit)} = \frac{[\text{Kolesterol}]}{\text{Waktu inkubasi}}$$

$$\Delta \text{Aktivitas}(\%) = \frac{\text{Aktivitas} - \text{Aktivitas kontrol} \times 100}{\text{Aktivitas kontrol}}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi

Rimpang Bangle yang telah dihaluskan diekstraksi dengan etanol 30%. Pemilihan etanol sebagai pelarut dikarenakan etanol 30% merupakan pelarut yang umum digunakan dalam pembuatan jamu dan obat-obatan fitofarmaka (Darusman *et al* 2001). Rendemen yang diperoleh dari ekstrak etanol rimpang bangle adalah sebesar 11,36%. Karena senyawa target yang diinginkan merupakan golongan steroid maka ekstrak etanol ini kemudian dipartisi lagi menggunakan kloroform (Harborne 1987). Rendemen yang diperoleh dari ekstrak kloroform adalah sebesar 6,42%.

Metode ekstraksi yang dilakukan adalah maserasi (ekstraksi tanpa pemanasan). Metode ini sama dengan metode ekstraksi yang dilakukan pada kajian bangle sebagai pelangsing (Febrian 2004). Sebelum rimpang bangle diekstraksi dengan etanol dilakukan proses defatting terlebih dahulu dengan heksana, yang bertujuan menghilangkan senyawa-senyawa lemak yang dapat mengganggu tahapan analisis selanjutnya.

### Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom

Ekstak kloroform yang telah diperoleh kemudian dianalisis dengan KLT menggunakan berbagai pelarut, baik pelarut polar maupun pelarut nonpolar, yaitu aseton, asam asetat, etanol, etil asetat, dietil eter, heksana, metanol, kloroform, dan 2-butanol. Pelat KLT yang digunakan adalah pelat KLT silika gel 60 GF<sub>254</sub>. Setelah dianalisis dengan berbagai pelarut tunggal, analisis KLT kemudian dilanjutkan dengan menggunakan campuran pelarut sampai diperoleh pemisahan komponen senyawa yang terbaik.

Analisis KLT dari fs dengan pemilihan pelarut terbaik diperoleh pada campuran kloroform dan heksana dengan perbandingan 9:1. Pengamatan di bawah sinar UV menunjukkan 11 noda seperti yang terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2 Kromatogram fs dengan pelarut terbaik.

Hasil KLT ini kemudian dijadikan dasar untuk pemisahan fraksi-fraksinya menggunakan kromatografi kolom. Kromatografi kolom dilakukan menggunakan silika gel sebagai fase diam dan eluen kloroform dan heksana sebagai fase gerak. Sampel dielusi dengan heksana, kemudian secara bertahap ditingkatkan kepolarannya dengan penambahan kloroform.

Tabel 1 Hasil fraksinasi steroid rimpang bangle

Fraksi	Bobot (g)	Rendemen (%)	Warna Fraksi		Steroid*
			Awal	Uji LB	
1	0,0092	0,90	Tak Berwarna	Tak Berwarna	-
2	0,0034	0,33	Tak Berwarna	Tak Berwarna	-
3	0,0359	3,51	Kuning	Hijau	+
4	0,0513	5,02	Kuning	Hijau	+++
5	0,0269	2,63	Jingga	Hijau	+++
6	0,0257	2,52	Jingga	Hijau	++
7	0,0645	6,31	Jingga	Jingga	-
8	0,0619	6,06	Jingga	Hijau	++
9	0,1048	10,26	Jingga	Jingga	-
10	0,0033	0,32	Coklat	Coklat	-
11	0,0586	5,74	Coklat	Coklat	-
12	0,0620	6,07	Coklat	Coklat	-
13	0,0524	5,13	Coklat	Coklat	-
14	0,0714	6,99	Coklat	Coklat	-

\*: +: terdeteksi, -: tidak terdeteksi

Elusi kromatografi kolom dapat memisahkan 14 fraksi. Hasil fraksi tersebut dapat dilihat pada Tabel 1. Secara umum ke-14 fraksi ini setelah dikeringkan menghasilkan pasta dengan warna yang berbeda-beda, yaitu tak berwarna, kuning, jingga, dan coklat.

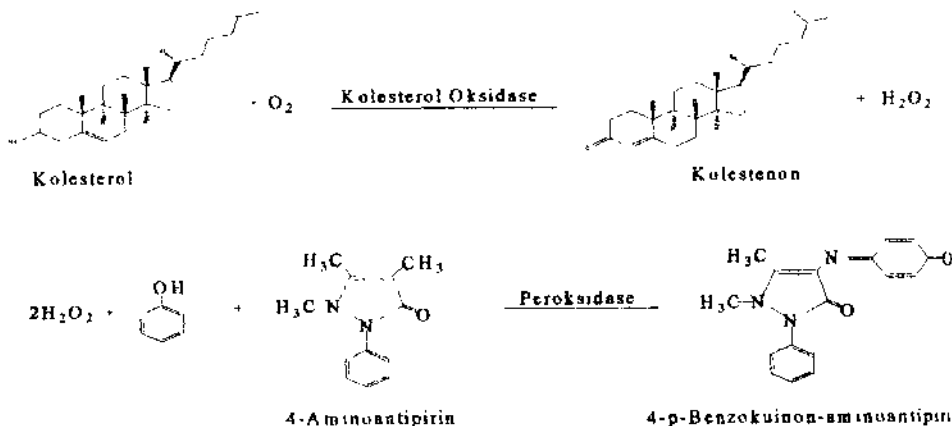
Seluruh fraksi yang didapatkan kemudian diuji fitokimia steroid dengan uji Liebermann-Burchard (LB) yang merupakan campuran  $H_2SO_4$  pekat, anhidrida asetat, dan  $CHCl_3$  dengan perbandingan 1:20:50 ml dan dipanaskan pada suhu  $85-95^\circ C$  selama 15 menit. Fraksi yang positif mengandung steroid akan menghasilkan warna hijau pada sampel yang diuji. Dari ke-14 fraksi yang diuji, 5 fraksi diantaranya, yaitu fraksi 3, 4, 5, 6, dan 8 positif mengandung steroid (Tabel 1). Fraksi-fraksi ini kemudian diujikan terhadap aktivitas enzim kolesterol oksidase secara *in vitro*.

### Uji *in vitro* Fraksi Steroid terhadap Aktivitas Kolesterol Oksidase

Untuk mengetahui kemampuan ekstrak bangle dalam menurunkan kolesterol, dilakukan uji terhadap aktivitas kolesterol oksidase secara *in vitro*. Uji yang dilakukan menggunakan metode kit Randox. Metode ini menggunakan prinsip yang telah dikembangkan oleh allain *et al.* (1974).

Substrat kolesterol dioksidasi oleh enzim kolesterol oksidase menghasilkan kolestenon dan peroksida. Peroksida yang terbentuk, fenol, dan amino antipirin kemudian akan bereaksi dengan enzim peroksidase menghasilkan 4-p-benzokuinon aminoantipirin. Senyawa yang terbentuk ini akan menghasilkan warna merah muda sehingga dapat diukur secara spektrofotometri. Semakin tinggi aktivitas enzim kolesterol oksidase maka jumlah kolesterol yang dioksidasi menjadi kolestenon akan semakin banyak, sehingga warna merah muda yang terbentuk intensitasnya semakin pekat (Gambar 3).

Seluruh fraksi yang positif mengandung steroid diujikan terhadap aktivitas kolesterol oksidase. Perubahan aktivitas yang disebabkan oleh fraksi-fraksi tersebut ditunjukkan oleh Gambar 4. Semua fraksi tersebut diujikan pada konsentrasi 200 ppm, karena menurut Rudita (2005) ekstrak diduga steroid rimpang bangle yang mengakibatkan perubahan aktivitas kolesterol oksidase terbesar didapatkan pada konsentrasi 200 ppm. Rudita melakukan penelitian secara *in vitro* untuk mendapatkan aktivitas kolesterol oksidase optimum dengan cara memvariasikan nilai konsentrasi. Untuk ekstrak steroid percobaan dilakukan pada tiga konsentrasi, yaitu 100, 200, dan 300 ppm. Dan nilai optimum didapatkan pada konsentrasi 200ppm, yaitu sebesar -17,89%.



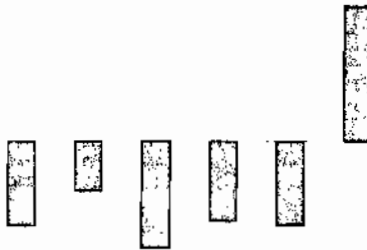
Gambar 3. Reaksi penentuan kolesterol

Berdasarkan uji aktivitas enzim kolesterol oksidase, bila dibandingkan dengan kontrol, hasil penambahan fraksi 8 yang menunjukkan peningkatan aktivitas (sebesar 30,37%). Sedangkan penambahan 4 fraksi lainnya dan penambahan ekstrak kloroform menunjukkan penurunan aktivitas. Penurunan aktivitas terbesar diperoleh pada penambahan fraksi 4, yaitu sebesar

24,15%. Ekstrak  $\text{CHCl}_3$ , fraksi 3, fraksi 5, dan fraksi 6 menghasilkan perubahan aktivitas kolesterol oksidase berturut-turut sebesar -19,09%; -11,09%; -18,04%; dan -19,14%.

Peningkatan dan penurunan aktivitas kolesterol oksidase ini dikarenakan penambahan fraksi steroid ekstrak Bangle bersama dengan substrat kolesterol dapat bersifat sebagai katalis reaksi (aktivator) atau inhibitor enzim.

Hasil uji aktivitas menunjukkan fraksi 8 mampu menjadi katalisator enzim kolesterol oksidase, karena mampu meningkatkan aktivitas enzim sebesar 30,37%. Kemampuannya sebagai aktivator berarti fraksi ini memiliki potensi sebagai penurun kolesterol karena mampu mempercepat reaksi oksidasi kolesterol.



Gambar 4 Perubahan aktivitas kolesterol oksidase terhadap penambahan fraksi steroid ekstrak bangle

Uji aktivitas juga menunjukkan bahwa fraksi 3, 4, 5, 6, dan ekstrak kloroform bangle dapat menjadi inhibitor kolesterol oksidase karena mampu menurunkan aktivitas enzim. Penurunan terbesar diakibatkan oleh fraksi 3, yaitu sebesar 27,14%.

Untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada fraksi-fraksi aktif ini dilakukan identifikasi senyawa dengan spektroskopi UV-Vis dan Inframerah.

#### Spektroskopi UV

Fraksi yang dianalisis dengan spektrofotometer UV dan IR dipilih fraksi yang menyebabkan perubahan nilai aktivitas kolesterol oksidase tertinggi dan terendah, yaitu fraksi 4 dan fraksi 8.

Spektrofotometer UV-Vis yang digunakan adalah spektrofotometer Genesys 10 uv double beam. Hasil spektroskopi UV fraksi 4 dan 8, serta hasil spektroskopi UV pelarut kloroform dapat dilihat pada lampiran 7 dan 8. Interpretasi spektrumnya disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Panjang gelombang maksimum fraksi aktif steroid

Fraksi	$\lambda$ Maksimum
4	272
	240
8	268
	238
	202

Hasil analisis spektrum UV menunjukkan bahwa fraksi 4 memiliki panjang gelombang yang memberikan serapan tertinggi ( $\lambda$  maksimum) 272 dan 240 nm. Sedangkan fraksi 8 memiliki  $\lambda$  maksimum 268, 238, dan 202 nm. Hasil analisis spektrum UV pelarut kloroform memiliki  $\lambda$  maksimum 240 nm. Serapan maksimum ini menunjukkan adanya transisi elektron dari tingkat orbital  $n \rightarrow \sigma^*$  dan  $n \rightarrow \pi^*$ .

## Spektroskopi Inframerah

Spektrofotometer IR yang digunakan adalah spektrofotometer Excalibur series BIO-RAD. Pengukuran sampel dilakukan dalam pelet KBr. Hasil spektrum inframerah dan beberapa gugus fungsi yang dikandung oleh fraksi 4 dan 8 disajikan oleh Tabel 6.

Tabel 3. Absorpsi spektrum IR fraksi 4 dan 8

Fraksi	Bilangan Gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )		Gugus Fungsi*
	Hasil	Pustaka	
4	3390,0	3400-3300	O-H
	1265,9	1300-1000	C-O
	1680,6	1650	C=C
	2916,4	3000	C-H
8	3396,3	3400-3300	O-H
	1257,6	1300-1000	C-O
	1513,9	1650	C=C
	2938,8	3000	C-H

\* Sumber: Pavia *et al.* (1996)

Dari hasil analisis spektrum inframerah, kedua fraksi diduga mengandung senyawa bergugus fungsi O-H, karena adanya serapan pada panjang gelombang disekitar 3400-3300  $\text{cm}^{-1}$ , yang dikonfirmasi dengan kehadiran C-O disekitar 1300-1000  $\text{cm}^{-1}$ . Selain itu juga diduga terdapat gugus C=C yang ditandai dengan adanya serapan disekitar 1650  $\text{cm}^{-1}$ . Ikatan C=C ini dikonfirmasi dengan adanya rantai C-H alifatik di sekitar/lebih kecil 3000  $\text{cm}^{-1}$ .

## KESIMPULAN

Hasil ekstraksi rimpang bangle dengan etanol menghasilkan rendemen sebesar 11,36%, sedangkan ekstrak kloroform menghasilkan rendemen 6,42%. Fraksinasi terhadap steroid rimpang bangle menghasilkan 14 fraksi. Fraksi 3, 4, 5, 6, dan 8 merupakan fraksi yang positif terhadap uji steroid.

Hasil uji aktivitas enzim kolesterol oksidase menunjukkan fraksi yang menghasilkan peningkatan aktivitas kolesterol oksidase terbesar adalah fraksi 8, yaitu sebesar 30,37%, sedangkan fraksi yang menghasilkan penurunan aktivitas kolesterol oksidase terbesar adalah fraksi 4, yaitu sebesar 24,15%. Dapat dikatakan bahwa ekstrak diduga steroid memiliki kecenderungan sebagai aktivator atau inhibitor enzim kolesterol oksidase.

Hasil spektroskopi UV menunjukkan bahwa  $\lambda$  maksimum fraksi 4 dan 8 serta pelarut kloroform masing-masing sebesar 272, 268, dan 240 nm. Hasil analisis spektrum IR menunjukkan bahwa kedua fraksi tersebut memiliki gugus fungsi C=C, C-H, C-O, dan O-H.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20: 470-475.
- Darusman LK, Rohaeti E, Sulistyani. 2001. Kajian senyawa golongan flavonoid asal tanaman bangle sebagai senyawa peluruh lemak melalui aktivitas lipase. Pusat Studi Biofarmaka-Lembaga Penelitian. IPB.

- Darusman LK. 2003. Standardisasi daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* L), keamanan, dan kemanfaatannya sebagai pelangsing/penurun kolesterol. Pusat Studi Biofarmaka-Lembaga Penelitian. IPB.
- Dyah Iswanti, *et.al.* 2005. Ekstrak bangle sebagai pelangsing: aktivitasnya terhadap enzim lipase. Prosiding Seminar Nasional kimia XVI, Yogyakarta, 8-17.
- Dyah Iswanti, Darusman LK, Gunawan E, Nurulita Y. 2003. Identifikasi senyawa bioaktif daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* L.) sebagai pelangsing dengan menggunakan metode enzimatis. *J Gakuryoku* 9: 138-142.
- Febnany S. 2004. Pengaruh beberapa ekstrak tunggal bangle dan gabungannya yang berpotensi meningkatkan aktivitas enzim lipase secara *in vitro* [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Grundy SM. 1991. Multifactorial etiology of hypercholesterolemia: implication for prevention of coronary heart disease. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 11:1619-1635.
- Harborne JB 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah K Padmawinata & I Soediro. Editor S Niksolihin. Bandung: ITB.
- Hernani R, Wijanarko W, Hayani E. 1990. Identifikasi komponen bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) secara kromatografi lapis tipis. *Buletin Penelitian Rempah dan Obat. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*. Bogor 5:111-114.
- Heyne K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Penerjemah Balitbang Kehutanan. Jakarta: Yayasan Sarana Warna Jaya.
- Kadansman I. 2000. Isolasi dan identifikasi senyawa kimia bioaktif dari rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Masuda T, Jitoe A. 1994. Antioxidative and antiinflammatory compounds from tropical gingers: isolation, structure determination, and activities of cassumunis A, B, and C, new complex curcuminoids from *Zingiber cassumunar*. *J Agric Food Chem* 41:1850-1856.
- Pollegioni L, Gadda G, Ambrosius D, Ghisla S, Piloni MS. 1999. Cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*: effect of surfactans and organic solvents on activity. *Biotechnol Appl Biochem* 30:27-33.
- Rudita RA. 2005. Pengaruh beberapa ekstrak rimpang bangle terhadap aktivitas enzim kolesterol oksidase secara *in vitro* [skripsi]. Siap terbit. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Sastrapradja S. 1977. *Ubi-ubian*. Lembaga Biologi Nasional. Jakarta. LIPI.
- Simons LA. 2002. Dietary phytosterols as cholesterol lowering agents in humans. *Am J Cardiol* 90:737-740
- Wijayakusuma HMH, Dalimartha S, Wirian AS. 1997. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jakarta: Pustaka Kartini.
- Wijayakusuma HMH. 2002. *Manfaat dan Penggunaan Rempah, Rimpang, dan Umbi*. Jakarta: Milenia Popular.
- Wrahadikusumah M. 1985. *Biokimia: Metabolisme Energi, Karbohidrat, dan Lipid*. Bandung: ITB.