

**UJI SITOTOKSISITAS SERBUK BUAH MENGGUDU
(*Morinda citrifolia* L.) DENGAN METODE
“BRINE SHRIMP LETHALITY TEST”**

OLEH :

MARHAWANI

H51197051



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2002**

SKRIPSI



OLEH :

MARHAWANI

H51197051



PERPUSTAKAAN PUSAT UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. Terima	13 - 10 - 2003
Asal Dari	MIPA
Banyaknya	1 (satu) b. j.
Harga	Gratis
No. Inventaris	02 10 13 174
No. Kias	16810

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR

2002

**UJI SITOTOKSISITAS SERBUK BUAH MENGGKUDU
(*Morinda citrifolia* L.) DENGAN METODE
“BRINE SHRIMP LETHALITY TEST”**

OLEH :

MARHAWANI

H51197051

Skripsi untuk melengkapi tugas dan memenuhi
syarat untuk memperoleh gelar sarjana

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2002

UJI SITOTOKSISITAS SERBUK BUAH MENGGKUDU
(*Morinda citrifolia* L.) DENGAN METODE
"BRINE SHRIMP LETHALITY TEST"

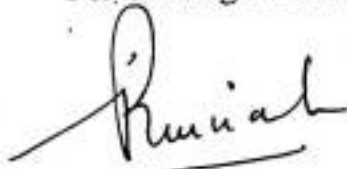
Disetujui oleh

Pembimbing Utama



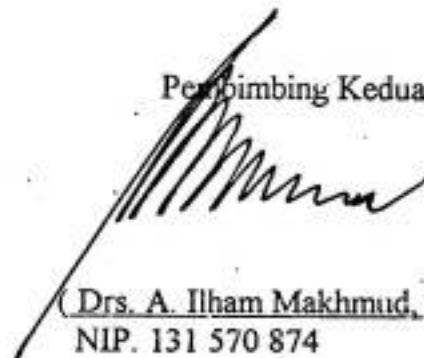
(Dra. Eva Firmina Sabu, M.Sc.)
NIP. 130 369 540

Pembimbing Pertama



(Dra. Nursiah Hasyim, CES.)
NIP. 130 937 014

Pembimbing Kedua



(Drs. A. Ilham Makhmud, Dipl. Sc.)
NIP. 131 570 874

Pada Tanggal 23 Agustus 2002

UJI SITOTOKSISITAS SERBUK BUAH MENGGKUDU
(*Morinda citrifolia* L.) DENGAN METODE
"BRINE SHRIMP LETHALITY TEST"

Disetujui oleh

Pembimbing Utama



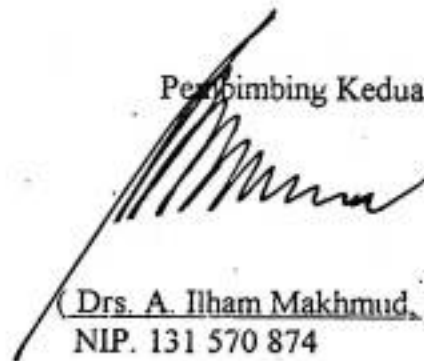
(Dra. Eva Firmina Sabu, M.Sc.)
NIP. 130 369 540

Pembimbing Pertama



(Dra. Nursiah Hasyim, CES.)
NIP. 130 937 014

Pembimbing Kedua



(Drs. A. Ilham Makhmud, Dipl. Sc.)
NIP. 131 570 874

(Pada Tanggal 23 Agustus 2002

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas rahmat, hidayah dan perkenaan-Nya sehingga penyusunan skripsi ini dapat selesai.

Pada kesempatan ini dengan penuh kerendahan hati kami ucapkan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada Ibu Dra. Eva Firmina Sabu, M.Sc. selaku pembimbing utama, Dra. Nursiah Hasyim, CES sebagai pembimbing pertama serta Bapak Drs. Andi Ilham Makhmud, Dipl.Sc. sebagai pembimbing kedua, atas kesediaannya meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam membantu dan membimbing penulis hingga selesainya skripsi ini.

Pada kesempatan ini pula, tak lupa kami mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
2. Ketua Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
3. Bapak/Ibu dosen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam khususnya jurusan Farmasi.
4. Seluruh staf dan karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
5. Sahabat dan rekan-rekan angkatan '97 Jurusan Farmasi : Ika, Ummu Kulsum, Syahriani Z., Hasni, Imelda, Fitri, Endhah dan semua pihak yang turut membantu

dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak sempat penulis sebutkan satu persatu.

Terima kasih, semoga Allah SWT berkenan membalasnya.

Akhirnya kepada keluarga tercinta ayahanda Midu, Ibunda Hafsah, Kak Ancu, saudara-saudaraku serta seluruh keluarga yang telah mendoakan serta memberikan bantuan moril maupun materil tanpa pamrih dan ketulusan hati.

Bersama dengan ini penulis menyampaikan mohon maaf yang sebesar-besarnya atas segala keterbatasan dan kesalahan selama ini. Semoga hal ini dapat menjadi cambuk dan pelajaran yang sangat berharga dikemudian hari.

Demikian pula dalam penulisan ini, penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kesalahan, oleh karena itu berbagai kritik dan saran akan sangat berguna untuk proses belajar yang tidak pernah berhenti. Semoga penulisan ini bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi penulis sendiri.

Makassar, Mei 2002

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian uji sitotoksik serbuk buah segar mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan sediaan kapsul yang ada di pasaran dengan metode "Brine Shrimp Lethality Test", dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Diamati jumlah kematian larva udang setelah diberi perlakuan selama 24 jam dalam beberapa konsentrasi dan efek sitotoksik diperoleh dengan menentukan LC_{50} . Serbuk buah yang telah dilarutkan dalam air suling, diencerkan dengan air laut dan dibuat konsentrasi berturut-turut 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$. Sebagai pembanding positif digunakan larutan siklofosfamid (0,2%) dengan konsentrasi 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$ dan pembanding negatif digunakan air suling dengan konsentrasi yang sama. Tiap perlakuan digunakan 10 ekor larva udang dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil penelitian dihitung dengan metode grafik probit log konsentrasi hingga diperoleh nilai LC_{50} . Hasilnya untuk serbuk buah yaitu $81,71 \pm 21,73$ $\mu\text{g/ml}$, sediaan kapsul $91,03 \pm 16,87$ $\mu\text{g/ml}$ dan pembanding positif sebesar $49,71 \pm 15,13$ $\mu\text{g/ml}$, sedangkan pada pembanding negatif tidak ada larva udang yang mati. Berdasarkan nilai LC_{50} dari "Anderson Bioassay" maka dapat disimpulkan bahwa serbuk buah mengkudu bersifat sitotoksik tapi tidak sekuat dengan pembanding positif.

ABSTRACT

A research concerning cytotoxicity effect of the powder of the fresh fruit of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) and its the branded capsule with a "Brine Shrimp Lethality Test" method had been conducted. This research was observed by the mortality of brine shrimp nauplii (*Artemia salina* Leach) after treated with varies of concentrations for 24 hours. The cytotoxic effect was concluded from the LC₅₀ value of "mengkudu" powder. The powder were dissolved with distilled water and diluted with sea water, to get the concentrations of 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 µg/ml respectively. Cyclophosphamide solution (0,2%) the concentrations of 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 µg/ml was used as a positive control and distilled water as a negative control in the same concentration. Ten brine shrimps were administered to each treatment, and was done in three replication. The number of dead brine shrimps were counted and by using probit log concentration methode, to obtain LC₅₀ value. The result was 81.75 ± 21.73 µg/ml for the powder, 91.03 ± 16.87 µg/ml for the capsule and 49.71 ± 15.13 µg/ml for the positive control. There was no dead brine shrimp was found in the negative control. According to "Anderson Bioassay" of LC₅₀ value, it was concluded that the "mengkudu" powder is cytotoxic but lesser than the control positif.

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL	i
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II POLA PENELITIAN	4
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	6
III.1 Uraian Umum	6
III.1.1. Klasifikasi Tumbuhan.....	6
III.1.2. Nama Daerah Tumbuhan	6
III.1.3. Klasifikasi Hewan Uji	7
III.1.4. Morfologi	7
A. Tumbuhan	7
B. Hewan Uji	8
III.1.5. Kandungan Kimia Tumbuhan	9
III.1.6. Kegunaan Tumbuhan	10

III.2	Uraian Tentang Serbuk	10
III.3.	Uraian Tentang Pembelahan Sel	11
III.4.	Uji Hayati Produk Bioaktif Alam	13
III.5.	Siklofosfamid	15
BAB IV	Pelaksanaan Penelitian	17
BAB V	Hasil dan Pembahasan	21
V.1	Hasil Penelitian	21
V.2	Pembahasan	21
BAB VI	Kesimpulan dan Saran	25
VI.1	Kesimpulan	25
VI.2	Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26
TABEL,		
LAMPIRAN		
GAMBAR		

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1a.	Perhitungan LC_{50} Serbuk Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Menurut Metode Grafik Probit Log Konsentrasi	31
Lampiran 2a.	Perhitungan Standar Deviasi LC_{50} Serbuk Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Berdasarkan Nilai Bobot Perprobit .	33
Lampiran 1b.	Perhitungan LC_{50} Kapsul Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Menurut Metode Grafik Probit Log Konsentrasi	35
Lampiran 2b.	Perhitungan Standar Deviasi LC_{50} Kapsul Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Berdasarkan Nilai Bobot Perprobit .	37
Lampiran 1c.	Perhitungan LC_{50} Pembanding Positif Siklofosfamid Menurut Metode Grafik Probit Log Konsentrasi	39
Lampiran 2c.	Perhitungan Standar Deviasi LC_{50} Pembanding Positif Siklofosfamid Berdasarkan Nilai Bobot Perprobit	41
Lampiran 3	Analisa Data Pengamatan Kematian Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach Dengan Metode Rancangan Faktorial	43

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Data Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach Setelah 24 Jam Perlakuan	30
Tabel 2	Harga Probit Sesuai Prosentasenya	46
Tabel 3	Nilai Bobot Perprobit	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Skema Kerja	29
Gambar 2a	Grafik Hubungan Log Konsentrasi Serbuk Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Terhadap Harga Probit Sesuai Persentase Kematian	48
Gambar 2b	Grafik Hubungan Log Konsentrasi Kapsul Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Terhadap Harga Probit Sesuai Persentase Kematian	49
Gambar 2c	Grafik Hubungan Log Konsentrasi Siklofosamid Terhadap Harga Probit Sesuai Persentase Kematian	50
Gambar 3	Histogram Jumlah Rata - Rata Larva Udang Yang Mati Terhadap Serbuk dan Kapsul Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) dan Kontrol Pada Tiap Konsentrasi	51
Gambar 4	Siklus Hidup <i>Artemia salina</i> Leach	52
Gambar 5	Foto Tanaman Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	53
Gambar 6	Foto Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)	54



BAB I
PENDAHULUAN

Belakangan ini telah banyak pengujian sitotoksisitas yang dikembangkan untuk pencarian produk alam yang berpotensi sebagai bahan antineoplastik. Salah satu metode adalah "Brine Shrimp Lethality Test" sebagai uji pendahuluan senyawa antitumor karena sebagian besar senyawa antitumor adalah sitotoksik. Senyawa yang mempunyai kemampuan membunuh larva udang diperkirakan juga mempunyai kemampuan membunuh sel kanker dalam kultur sel (1, 2, 3).

Penyakit kanker makin dikenal sebagai salah satu ancaman terbesar bagi kesehatan dan merupakan penyakit yang sangat ditakuti. Di negara yang telah maju dan telah berhasil membasmi penyakit infeksi, kanker merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung (2, 3). Dari kasus kanker baru yang jumlahnya diperkirakan 9 juta setiap tahun, lebih dari setengahnya terdapat di negara yang sedang berkembang. Sebagian besar dari penderita itu tak tersembuhkan pada saat penyakit mereka terdiagnosis dan bahkan angka kematian penderita kanker semakin meningkat (4).

Dalam bidang diagnose dan terapi selalu dicapai kemajuan, tetapi kemungkinan untuk sembuh dari penyakit kanker jarang melampaui 20% (5). Pengobatan dalam bentuk kemoterapi kurang spesifik karena kemoterapi dilakukan bila operasi dan radioterapi tidak berhasil, karena bersifat sangat toksik dan jarang

sekali bersifat menyembuhkan bahkan akan menimbulkan kerusakan parah pada sel sehat. (5, 6).

Sehubungan dengan hal tersebut, di alam Indonesia telah tersedia banyak bahan kimia bahan alam yang bersifat bioaktif yang telah digunakan dalam peningkatan derajat kesehatan masyarakat (7). Tumbuh-tumbuhan tersebut terkandung bahan yang berkhasiat yang cukup poten (kuat) yang dibutuhkan oleh tubuh kita tanpa ada efek samping yang merugikan serta biayanya murah (8).

Secara empiris telah banyak digunakan senyawa kimia bahan alam ini juga untuk mengobati penyakit tumor atau kanker. Obat antitumor dari bahan alam bersifat toksik terhadap fase tertentu dari siklus sel tumor. Bahan aktif yang terdapat dalam bahan alam tersebut mengganggu salah satu proses dalam perkembangan sel tumor, tetapi tidak bersifat toksik atau mengganggu sel normal (5).

Salah satu bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker yang banyak dipublikasikan akhir-akhir ini adalah buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Studi dan penelitian tentang Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terus dilakukan oleh berbagai lembaga penelitian dan Universitas. Tahun 1993, jurnal "Cancer Letter" melaporkan bahwa beberapa peneliti dari Jepang melakukan riset terhadap 500 jenis tanaman mengklaim bahwa mereka menemukan zat antikanker (damnacanthal) yang terkandung dalam Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) (8).

Berdasarkan potensinya sebagai obat antikanker, maka perlu dilakukan uji kesitotoksikan serbuk buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) menggunakan metode "Brine Shrimp Lethality Test". Serbuk buah ini diperoleh dari jus buah yang

dikeringkan menjadi serbuk, dengan menggunakan freeze-drier yang selanjutnya bisa dikemas dalam bentuk kapsul, untuk menutupi bau dari buahnya yang tidak sedap.

“Brine Shrimp Lethality Test” adalah merupakan salah satu metode uji pendahuluan senyawa antitumor. Walaupun pengujian ini tidak spesifik untuk aktivitas antitumor tetapi merupakan indikasi sitotoksik yang baik dan menunjukkan korelasi yang kuat dengan pengujian antitumor lainnya. Selain itu metode ini pengujiannya lebih cepat, murah, mudah dan tidak memerlukan kondisi aseptis (10, 11).

Maksud dari penelitian ini adalah menguji efek sitotoksik dari serbuk buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan menggunakan metode “Brine Shrimp Lethality Test”. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan LC_{50} dai serbuk buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap larva udang (*Artemia saline* Leach) yang diduga berkaitan dengan sifat antikankernya.

BAB II

POLA PENELITIAN

II. 1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini disiapkan sesuai kebutuhan.

II. 2 Penyiapan Bahan Penelitian

II.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang matang diambil dari Kabupaten Sinjai sebanyak 10 buah.

II.2.2 Pengolahan Sampel

Sampel dicuci bersih kemudian dikuliti dan dihancurkan selanjutnya disaring.

II.2.3 Pembuatan Serbuk

Jus buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dibekukan dalam freezer kemudian dikeringkan dengan menggunakan alat pengering beku (freeze-drier).

II.2.4 Penyiapan Larva

Telur Udang (*Artemia salina* Leach) ditetaskan selama 48 jam sebelum dilakukan pengujian. Penetasan ini dilakukan dengan cara merendam telur udang dalam air laut dengan penerangan dan aerasi. Larva yang berumur 48 jam digunakan sebagai hewan uji.

BAB II

POLA PENELITIAN

II. 1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini disiapkan sesuai kebutuhan.

II. 2 Penyiapan Bahan Penelitian

II.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang matang diambil dari Kabupaten Sinjai sebanyak 10 buah.

II.2.2 Pengolahan Sampel

Sampel dicuci bersih kemudian dikuliti dan dihancurkan selanjutnya disaring.

II.2.3 Pembuatan Serbuk

Jus buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dibekukan dalam freezer kemudian dikeringkan dengan menggunakan alat pengering beku (freeze-drier).

II.2.4 Penyiapan Larva

Telur Udang (*Artemia salina* Leach) ditetaskan selama 48 jam sebelum dilakukan pengujian. Penetasan ini dilakukan dengan cara merendam telur udang dalam air laut dengan penerangan dan aerasi. Larva yang berumur 48 jam digunakan sebagai hewan uji.

II.2.5 Pembuatan Sampel Uji

Serbuk buah dilarutkan dalam air suling untuk mendapatkan konsentrasi 2 mg/ml. Demikian pula dengan serbuk dari sediaan kapsul. Kemudian dari larutan stok tersebut dibuat kadar 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$ dengan menggunakan mikropipet lalu ditambahkan air laut masing - masing 5 ml.

II.3 Pelaksanaan Uji Sitotoksitas

Larva (*A. salina* Leach) yang telah berumur 48 jam dimasukkan ke dalam vial yang berisi larutan sampel dan air laut. Setiap vial serbuk terdapat 10 ekor larva (*A. salina* Leach) kemudian dicukupkan volumenya dengan air laut sampai 10 ml dan selanjutnya disimpan di tempat yang cukup mendapat sinar lampu. Pengamatan larva yang mati dihitung setelah 24 jam. Dilakukan pula uji yang sama terhadap kontrol positif yaitu larutan injeksi Siklofosfamid dengan konsentrasi 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$ dan kontrol negatif menggunakan air suling.

II.4 Pengumpulan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan ditabulasi dan dihitung dengan menggunakan analisis probit untuk menghitung LC_{50} .

II.5 Pembahasan Hasil

Pembahasan diuraikan berdasarkan hasil analisis data yang diperoleh dari hasil perhitungan.

II.6 Pengambilan Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan hasil dapat disimpulkan sitotoksitas serbuk, bahwa jika nilai LC_{50} dibawah 1000 $\mu\text{g/ml}$ dinyatakan sitotoksik dan berpotensi sebagai antikanker sedangkan jika nilai LC_{50} di atas 1000 $\mu\text{g/ml}$ dinyatakan tidak sitotoksik (10).



III.1.3 Klasifikasi Hewan Uji (17)

Filum	: Arthropoda
Kelas	: Crustacea
Sub Kelas	: Branchiopoda
Bangsa	: Anostraca
Suku	: Antimiidae
Marga	: Artemia
Jenis	: <i>Artemia salina</i> Leach

III.1.4 Morfologi (14, 15, 16,).

A. Tumbuhan

Mengkudu adalah tumbuhan liar yang banyak ditemukan dipantai, ladang, ataupun ditanam di pekarangan untuk sayur ataupun tumbuhan obat.

Mengkudu merupakan perdu atau pohon kecil yang tumbuh membengkok dengan ketinggian 3-8 meter, bercabang banyak dengan bentuk ranting yang bersegi empat.

Daun letaknya berhadapan-hadapan secara bersilang, bertangkai, bentuknya bulat telur lebar sampai berbentuk elips, panjang, 10-40 cm, lebar 5-17 cm, tebal, mengkilap, tepi rata, ujung runcing, pangkal menyempit, tulang daun menyirip dan warnanya hijau tua.

Bunganya berbentuk bongkol yang keluar dari ketiak daun dalam karangan 5-8 cm. Mahkota daun berbentuk tabung yang menyerupai bentuk terompet, berwarna putih dan berbau harum.

Buah bertangkai, bentuknya bulat lonjong, berupa buah buni majemuk yang berkumpul menjadi satu sebagai buah yang besar, panjang 5-10 cm, permukaan tidak rata benjol-benjol, berwarna hijau ketika mentah dan berwarna kuning pucat/kuning kotor ketika buah telah matang daging buahnya tebal dan banyak mengandung air, berbau busuk menyengat dengan biji warna cokelat kehitaman.

B. Hewan uji (14, 18)

Udang *Artemia salina* Leach mengalami beberapa fase hidup, tetapi secara jelas dapat dilihat dalam tiga bentuk yang sangat berlainan, yaitu bentuk telur, nauplii dan artemia dewasa. Telur yang baru dipanen dari alam berbentuk bulat dengan ukuran 0,2-0,3 mm. Telur yang menetas akan berubah menjadi nauplius.

Nauplius yang baru menetas ini berukuran kurang lebih 300 mikron. Di antara antenula terdapat bintik merah yang disebut "oselus" yang berfungsi sebagai mata nauplius. Dalam pertumbuhannya nauplius mengalami 15 kali perubahan bentuk yang merupakan satu tingkatan hidup, setelah itu berubah menjadi artemia dewasa. Waktu yang diperlukan sampai menjadi artemia dewasa umumnya sekitar 2-3 minggu. Artemia dewasa berbentuk silinder dengan panjang 12-15 mm. Tubuh

terbagi atas bagian kepala, dada dan perut. Pada bagian kepala terdapat 2 tangkai mata, 2 antena dan 2 antenula. Dada terbagi atas 12 segmen yang masing masing mempunyai sepasang kaki renang. Perut terbagi atas 8 segmen. Artemia dapat hidup pada air laut dengan salinitas 10-220 per mil, suhu 25-30°C, pH berkisar antara 7,3-8,4. Artemia dapat tumbuh cepat pada perairan laut tetapi tidak mempunyai pertahanan tubuh untuk mampu melawan predator, sehingga artemia selalu dalam keadaan berbahaya pada perairan dengan salinitas yang masih layak bagi kehidupan organisme karnivora. Namun demikian Artemia mempunyai mekanisme pertahanan ekologi yang sangat efisien melalui kemampuan beradaptasi fisiologi terhadap media bersalinitas tinggi yang sedangkan predator tidak dapat hidup.

Artemia dikenal mempunyai 2 macam cara reproduksi yaitu secara ovovipar yakni telur yang telah dibuahi menetas menjadi nauplius dan kemudian dilepas oleh induknya di dalam air. Cara lainnya adalah ovipar yaitu telur yang telah mencapai stadium gastrula yang terbungkus dengan kulit luar yang relatif tebal dikeluarkan oleh induknya dalam bentuk kista/telur.

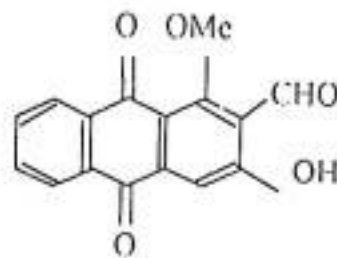
III.1.5 Kandungan Kimia Tumbuhan (8, 14, 16)

Buah mengkudu mengandung alkaloid triterpenoid, scopoletin, acubin, alizarin, antrakuinon, asam benzoat, asam oleat, asam palmitat, eugenol, hexanal, morindadiol, saranjidiol, morindin, morindon, asam asetat, asam

butanoat, asam dekanoat, glukosa, asam laurat, limonen, asam miristat, asam nonanoat, asam oktanoat, vitamin C.

Selain itu mengandung minyak menguap asam kapron dan asam kapriat serta mengandung zat yang dapat mencegah kanker (damnacanthal).

Struktur Damnacanthal



(3-hidroksi-1 metoksi antrakuinon-2 karboksaldehid)

III.1.6 Kegunaan Tumbuhan (8, 14, 15)

Buah mengkudu digunakan sebagai obat batuk, radang amandel, sariawan, tekanan darah tinggi, beri-beri, melancarkan kencing, radang ginjal, radang empedu, kencing manis, cacangan, sakit pinggang, jantung koroner, kolesterol, anti kanker, rematik, bronkhitis, sembelit, hepatitis, cacar air, menghaluskan kulit, antiobesitas, dan meningkatkan stamina.

III.2 Uraian Tentang Serbuk (8, 19, 20)

Serbuk adalah campuran kering bahan obat atau zat kimia yang dihaluskan, ditujukan untuk pemakaian oral atau untuk pemakaian luar (19).

Serbuk, bisa dibuat dari bahan obat tumbuh-tumbuhan yang dikeringkan secara alamiah, atau merupakan campuran dua atau lebih unsur kimia murni yang dibuat serbuk dalam perbandingan tertentu (20).

Proses pembuatan serbuk/kapsul mengkudu sebagai berikut : buah mengkudu matang dikeringkan (pengeringan beku/freez.-dried) sampai

menjadi bubuk atau tepung. Selanjutnya dapat dikemas dalam bentuk kapsul (8).

III. 3 Uraian Tentang Pembelahan Sel (3, 21, 22)

Salah satu paham yang paling berharga dari para biologawan abad kesembilan belas adalah bahwa setiap sel di bumi ini berasal dari sel yang telah ada dahulu. Keturunan yang dihasilkan dari reproduksi aseksual secara genetika identik dengan induk tunggalnya. Keturunan ini merupakan klon. Reproduksi aseksual terjadi dengan mitosis. Pada mitosis setiap kromosom dalam sel diduplikasi dan mengalami tiga periode selama interfase. Begitu mitosis itu lengkap, maka sel mulai dengan periode tumbuh (G1). Hal ini diikuti dengan periode sintesis DNA (S) dan selama itu kromosom terduplikasi. Kemudian periode tumbuh kedua (G2) terjadi sebelum mitosis berikutnya (M). Keempat periode ini merupakan siklus sel. Seluruh urutan fase dapat terselesaikan dalam waktu yang tepat dan sangat beragam bergantung pada tipe sel, spesies dan suhu.

Dalam beberapa hal, sel kanker mirip sel embrio misalnya dari proses pembelahan sel (secara mitosis sama-sama memulai pada periode tumbuh (G1), kemudian fase S (sintesis DNA) lalu ke fase tumbuh kedua (G2) sebelum terjadi mitosis berikutnya). Hal lain, bahwa sel kanker sebagai sel non diferensiasi sering memperlihatkan protein yang khas dan terdapat juga pada perkembangan sel normal (alfa fetoprotein (AFP) dan antigen

karsinoma CFA) juga sel kanker dan sel normal sama-sama berasal dari sel yang ada sebelumnya (memiliki hereditas bawaan).

Sedangkan perbedaan sel kanker dari sel normal, diantaranya adalah bahwa sel normal dalam pertumbuhan dan perkembangannya diatur dan terkontrol secara genetik, sedangkan sel kanker tidak. Sel kanker bersifat metastatik (menyebar ke tempat lain dan menimbulkan pertumbuhan baru) sedangkan sel normal tidak.

Adapun jenis pembelahan sel dibagi 2 yakni : (a) pembelahan secara mitosis, pembelahan sel setelah duplikasi kromosomnya dimana setiap sel anak mempunyai kandungan kromosom yang sama persis dengan induknya. Pembelahan sel ini sering terjadi pada proses fertilisasi. (b) pembelahan sel secara meiosis ialah pembelahan sel yang berturut-turut dengan hanya satu duplikasi kromosom yang menghasilkan empat sel yang masing-masing mengandung setengah jumlah kromosom dari sel induknya. Pembelahan sering terjadi pada proses diferensiasi.

Perubahan yang tepat yang menyebabkan sebuah sel bersifat kanker tidak diketahui. Adapun perubahan yang terjadi adalah bahwa sel kanker akan bermetastik, invasif dan menurun seperti suatu sifat genetika. Beberapa jenis kanker pada hewan percobaan disebabkan oleh beberapa virus, dan hal ini dapat juga terjadi pada manusia.

Suatu sel akan terhambat pertumbuhan dan perkembangannya karena adanya gangguan pada salah satu siklus sel yang esensial, apakah pada fase

sintesis DNA (fase S), fase pembentukan pada mitosis (fase M) atau juga penghambatan yang tidak spesifik pada suatu fase tertentu.

III.4 Uji Hayati Produk Bioaktif Alam (1, 2, 3, 9, 10)

Penelitian fitokimia saat ini lebih ditekankan pada penelitian untuk mendapatkan senyawa bioaktif. Uji hayati yang digunakan untuk tujuan ini sebaiknya sederhana pengerjaannya, dapat dilakukan dengan cepat, ekonomis dan menghasilkan korelasi statistik yang valid dengan bioktivitas yang diharapkan (10).

Belakang ini telah banyak pengujian sitotoksisitas yang dikembangkan untuk pencarian produk alam yang potensial sebagai bahan antineoplastik. Metode pengujian tersebut antara lain "Simple Bench-Top Bioassay (terdiri dari Uji lethal udang renek air asin, "Lemna Minor Bioassay" dan Crown-Gall Potato Disc Bioassay) dan pengujian pada pembelahan sel telur bulu babi (1,2).

Berdasarkan pada pemikiran bahwa efek farmakologi adalah toksikologi sederhana pada dosis yang rendah dan sebagian besar senyawa antitumor adalah sitotoksik (3), maka digunakan "Brine Shrimp Lethality Test" sebagai uji pendahuluan senyawa antitumor. Senyawa yang mempunyai kemampuan membunuh larva udang diperkirakan juga mempunyai kemampuan membunuh sel kanker dalam kultur sel (1).

Penggunaan Brine Shrimp adalah pengujian letalitas yang sederhana dan tidak spesifik untuk aktivitas antitumor, tetapi merupakan indikator sitotoksisitas yang baik dan menunjukkan korelasi yang kuat dengan pengujian antitumor lainnya seperti uji sitotoksisitas dan uji leukemia tikus. Karena kesederhanaan prosedur pengerjaan, biaya yang rendah serta korelasinya terhadap pengujian sitotoksisitas dan pengujian antitumor menjadikan "Brine Shrimp Lethality Test" sebagai uji hayati pendahuluan untuk aktivitas antitumor yang sesuai dan dapat dilakukan secara rutin di laboratorium dengan fasilitas sederhana (9, 10).

"Lemna Minor Bioassay" terutama digunakan sebagai uji pendahuluan terhadap bahan yang dapat menghambat dan meningkatkan pertumbuhan tanaman. Dengan pengujian ini dapat diamati bahwa senyawa antitumor alami juga dapat menghambat pertumbuhan lemna, walaupun korelasinya dengan pengujian antitumor lainnya kurang baik. Oleh karena itu pengujian ini lebih diarahkan untuk mencari herbisida dan stimulan pertumbuhan tanaman yang baru (1).

"Crown-Gall Potato Disc Bioassay" merupakan metode pengujian sitotoksisitas yang relatif cepat pengerjaannya, tidak mahal, tidak memerlukan hewan percobaan serta menunjukkan korelasi yang sangat baik dengan uji antitumor lainnya. Crown Gall merupakan suatu penyakit neoplastik pada tumbuhan yang disebabkan oleh bakteri gram negatif *Agrobacterium tumefaciens* yang selanjutnya menyebabkan pertumbuhan jaringan tumor

secara otonom dan tidak dipengaruhi oleh mekanisme kontrol normal tumbuhan. Pengujian dilakukan dengan mengukur kemampuan suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan tumor crown gall pada umbi kentang yang diinfeksi dengan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (1, 2, 10).

III. 5 Siklofosamid (2, 23)

Siklofosamid merupakan obat antikanker dan termasuk salah satu zat alkilator yang paling banyak digunakan, umumnya dalam bentuk monohidratnya. Obat ini merupakan obat tak spesifik terhadap siklus sel (2).

Senyawa pengalkilasi (alkilator) adalah senyawa reaktif yang dapat mengalkilasi DNA, RNA dan enzim-enzim tertentu. Senyawa ini digunakan terutama untuk pengobatan kanker pada jaringan limfoid dan sistem retikuloendotel seperti limposarkoma dan penyakit Hodgkin, leukemia limfositif dan mieloma. Efek sampingnya cukup besar yaitu dapat merusak sumsum tulang, menyebabkan leukopenia dan trombositopenia serta mecnkankan kekebalan (23).

Mekanisme kerjanya, yaitu melalui pembentukan senyawa kationik antara yang tidak stabil, diikuti pemecahan cincin membentuk ion karbonium reaktif. Ion ini bereaksi, melalui reaksi alkilasi, membentuk ikatan kovalen dengan gugus-gugus elektron donor, seperti gugus-gugus karboksilat, amin, fosfat dan tiol, yang terdapat pada struktur asam amino, asam nukleat dan protein, yang sangat dibutuhkan untuk proses biosintesis sel. Reaksi ini

membentuk hubungan melintang "(Cross-linking)" yang memisahkan rangkaian DNA dan mencegah mitosis. Akibatnya proses pembentukan sel terganggu dan terjadi hambatan pertumbuhan sel kanker (23).

BAB IV
PELAKSANAAN PENELITIAN

IV.1 Alat dan Bahan

IV.1.1 Alat-alat yang digunakan

1. Aerator (Biolife)
2. Cawan petri
3. Corong
4. Erlenmeyer
5. Freezer
6. Freeze-drier
7. Gelas piala
8. Gelas ukur
9. Kaca pembesar
10. Lampu penerangan
11. Mikropipet (Sacorex)
12. Timbangan analitik (Chyo)
13. Pipet tetes
14. Sendok tanduk

IV.1.2 Bahan-bahan yang digunakan

1. Air laut

sebanyak 37,336 gram dimasukkan dalam plastik kedap udara dan disimpan dalam freezer, selanjutnya ditimbang sesuai kebutuhan untuk membuat sampel uji.

IV.2.4 Penyiapan Larva (9)

Telur udang (*A. salina* Leach) sebanyak 50 mg direndam dalam wadah yang berisi air laut pada kondisi pH 7-8 di bawah cahaya lampu pada suhu 25°C, dan dilengkapi aerator. Telur udang akan menetas setelah 24 jam dan menjadi larva. Larva yang telah berumur 2 hari digunakan sebagai hewan uji.

IV.2.5 Pembuatan Sampel Uji (10)

Serbuk buah yang telah ditimbang dilarutkan dalam air suling hingga diperoleh konsentrasi 2 mg/ml sebagai larutan stok. Untuk sediaan kapsul, diambil 20 biji lalu serbuknya dicampur, ditimbang dan dibuat larutan stok dengan konsentrasi 2 mg/ml. Dari larutan stok tersebut dipipet ke dalam vial masing-masing 5 µl, 50 µl, 250 µl, 500 µl, 1000 µl, 2000 µl, 4000 µl, 5000 µl, 7500 µl, dengan menggunakan mikropipet, sehingga diperoleh konsentrasi 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 dan 1500 µg/ml, lalu ditambahkan 5 ml air laut. Kontrol positif dibuat dengan menggunakan injeksi siklofosfamid dengan konsentrasi 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 µg/ml dan perlakuan yang sama dengan sampel, sedangkan kontrol negatif menggunakan air suling dalam air laut.

IV.3 Pelaksanaan Pengujian (10)

Sebanyak 10 ekor larva udang (*A. salina* Leach) dimasukkan ke dalam masing-masing vial yang berisi larutan serbuk buah, dengan berbagai konsentrasi, kemudian volumenya dicukupkan sampai 10 ml dengan air laut. Masing-masing vial ditambahkan ekstrak ragi (3 mg dalam 5 ml air laut) sebanyak 1-2 tetes sebagai sumber makanan. Pengamatan terhadap jumlah larva yang mati dilakukan setelah 24 jam. Dilakukan pula uji yang sama terhadap serbuk dari sediaan kapsul, kontrol positif larutan injeksi siklofosfamid, dan kontrol negatif menggunakan air suling dalam air laut. Setiap sampel uji dan kontrol dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

IV.4 Pengumpulan dan Analisis Data

Data dikumpulkan dari hasil pengamatan jumlah larva yang mati setelah 24 jam dari tiap konsentrasi sampel dan kontrol. Data tersebut selanjutnya dihitung menggunakan analisis probit untuk memperoleh LC_{50} .

IV.5 Pembahasan Hasil

Pembahasan diuraikan berdasarkan hasil analisis data yang diperoleh dan hasil perhitungan.

IV.6 Pengambilan Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan hasil dapat disimpulkan sitotoksisitas serbuk, bahwa jika nilai LC_{50} dibawah 1000 $\mu\text{g/ml}$ dinyatakan sitotoksik dan berpotensi sebagai antikanker sedangkan jika nilai LC_{50} diatas 1000 $\mu\text{g/ml}$ dinyatakan tidak sitotoksik (10).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

V.1 Hasil Penelitian

Dari data pengamatan kematian larva udang setelah 24 jam perlakuan diperoleh hasil sebagai berikut :

1. Nilai LC_{50} untuk serbuk buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yaitu $81,71 \pm 21,73$ $\mu\text{g/ml}$ dengan rata-rata kematian larva udang 5,926.
2. Nilai LC_{50} untuk kapsul buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yaitu $91,03 \pm 16,78$ $\mu\text{g/ml}$ dengan rata-rata kematian larva udang 5,63.
3. Nilai LC_{50} untuk pembanding positif yaitu $49,71 \pm 15,13$ $\mu\text{g/ml}$ dengan rata-rata kematian larva udang 6,259.
4. Untuk pembanding negatif tidak ditemukan adanya kematian hewan uji.

Hasil pengamatan selengkapnya ditunjukkan pada tabel 1 (lampiran).

V.2 Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan pengujian sitotoksisitas serbuk buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang dibandingkan dengan sediaan kapsulnya yang beredar di masyarakat dengan pembanding positif larutan siklofosfamid dengan konsentrasi 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$ dan pembanding negatif air suling terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Pengamatan dilakukan setelah perlakuan selama 24 jam dengan parameter kematian larva udang.

Adapun sampel uji yang digunakan yaitu serbuk buah yang dibuat dari jus buah mengkudu yang matang, dikeringkan dengan menggunakan pengering beku. Dilakukan pula uji terhadap kapsul buah mengkudu yang telah beredar di masyarakat. Dengan maksud untuk membandingkan efek sitotoksisitas antara serbuk yang dibuat langsung dari buahnya dengan serbuk dari sediaan kapsul.

Penggunaan pembanding negatif air suling dimaksudkan untuk melihat apakah respon kematian larva udang benar-benar berasal dari sampel uji dan bukan disebabkan oleh faktor teknis perlakuan. Adapun air suling digunakan sebagai pembanding negatif karena sampel uji dilarutkan dalam air suling.

Siklofosamid yang merupakan obat antikanker digunakan sebagai pembanding positif dengan maksud untuk melihat apakah respon kematian dari hewan air benar-benar disebabkan oleh bahan kimia yang berkhasiat antikanker. Juga untuk melihat tingkat kesitotoksikan dari sampel uji dibandingkan terhadap tingkat kesitotoksikan dari siklofosamid.

Penelitian ini merupakan, penelitian secara *in vitro* yang dimaksudkan sebagai uji pendahuluan sitotoksisitas dari serbuk dan sediaan kapsul buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang dapat dijadikan sebagai informasi awal dalam pengujian efek antitumor secara *in vitro* lanjutan terhadap sel tumor yang lebih spesifik.

Uji sitotoksisitas dari serbuk buah mengkudu ini dihubungkan dengan efek antikanker/antitumor karena pada umumnya obat antikanker bersifat sitotoksik dan uji sitotoksik merupakan uji pendahuluan untuk senyawa

antitumor. Proses perkembangan dari telur menjadi larva udang dapat diasumsikan sama dengan pembelahan pada sel kanker. Sehingga apabila sampel uji dapat menghambat pertumbuhan dari larva udang dalam hal ini dapat mematikan larva udang maka diperkirakan juga mempunyai kemampuan menghambat/membunuh sel kanker.

Sampel uji dan pembanding positif dibuat dengan konsentrasi 1, 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 1500 $\mu\text{g/ml}$ ini dimaksudkan untuk melihat variasi respon yang diberikan dibawah dan, diatas konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ dan diujikan pada hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach berumur 48 jam, karena pada umur tersebut *Artemia salina* Leach mengalami pertumbuhan yang cepat sehingga diasumsikan sebagai pertumbuhan sel yang abnormal. Sebanyak masing-masing 10 ekor untuk tiap konsentrasi, sampel diujikan dengan parameter kematian setelah 24 jam dan diulang sebanyak 3 kali, dan ke dalam vial diberikan 1 tetes ragi untuk mengoptimalkan hasil yang diperoleh.

Efek sitotoksisitas dari masing-masing sampel dapat ditentukan dengan melihat LC_{50} -nya dari perhitungan data kematian larva udang *Artemia salina* Leach menggunakan metode analisis probit (lihat lampiran 1 dan 2).

Hasil perhitungan LC_{50} pada tabel 1 diperoleh bahwa tingkat sitotoksisitas antara serbuk dan sediaan kapsul tidak berbeda jauh, tetapi LC_{50} dari serbuk lebih kecil dibandingkan dengan LC_{50} dari sediaan kapsul, berarti serbuk lebih sitotoksik dibanding sediaan kapsul, hal ini mungkin dipengaruhi oleh proses pengemasan dari sediaan kapsul tersebut.

Bila dibandingkan antara kedua sampel uji tersebut dengan pembanding positif siklofosfamid maka nilai respon pembanding positif jauh lebih besar terhadap larva udang (tingkat sitotoksitasnya jauh lebih besar) yakni LC_{50} kecil, hal ini disebabkan karena siklofosfamid merupakan senyawa murni.

Hasil perhitungan data secara statistik dengan rancangan faktorial pada, jumlah kematian larva udang dari tiap sampel terhadap beberapa konsentrasi memperlihatkan adanya pengaruh yang sangat nyata. Hal ini dapat dilihat dari harga F hitung yang lebih besar dari F tabel pada taraf 1 % dan 5 % (lihat lampiran 3). Jadi terdapat pengaruh pemberian sampel dan variasi konsentrasi terhadap jumlah kematian larva udang. Analisis lanjutan dengan uji jarak beda nyata Duncan terhadap sampel uji, memperlihatkan perbedaan yang tak nyata (NS) antara serbuk dan sediaan kapsul. Hal ini menunjukkan bahwa serbuk sediaan kapsul, mempunyai tingkat kesitotoksikan yang tidak berbeda. Bila dibandingkan antara serbuk terhadap siklofosfamid memperlihatkan perbedaan yang tidak nyata (NS). Bila dibandingkan antara sediaan kapsul terhadap siklofosfamid memperlihatkan perbedaan yang sangat nyata (SS), hal ini menunjukkan bahwa tingkat kesitotoksikan antara kapsul dengan siklofosfamid berbeda.

Berdasarkan nilai LC_{50} dari serbuk dan sediaan kapsul buah, mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) serta pembanding, positif (Siklofosfamid) maka dapat diketahui bahwa sampel uji bersifat sitotoksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN



VI.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan hasil perhitungan data dapat disimpulkan bahwa berdasarkan nilai LC_{50} dari serbuk buah ($81,71 \pm 21,73 \mu\text{g/ml}$), sediaan kapsul ($91,03 \pm 16,87 \mu\text{g/ml}$) dan siklofosfamid ($49,72 \pm 15,13 \mu\text{g/ml}$) maka serbuk dan sediaan kapsul buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dapat mencegah pertumbuhan sel kanker (sitotoksik).

VI.2 Saran

Perlu dilakukan pengujian sitotoksitas dengan menggunakan sel kanker (cell - line).

DAFTAR PUSTAKA

1. Mc. Laughi, J.L., Chang, C.J. dan Smithm, D.L., (1991), "Bench-Top, Bioassay For the Discovery of Bioactive Natural Product, An Update", *Natural Products Chemistry*. Elseivier, Amsterdam, 1-9.
2. Munro, M.H.G., Luibrand, R.T., Blunt, J.W., (1987), "The Earch for Antiviral and Anticancer Compounds from Marine Organisme", Vol. I, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 106, 107.
3. Ganisswarna, G.S., (1995), "Farmakologi dan Terapi", edisi 4, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, 686-689.
4. Musadad, A., (1997), "Pereda Nyeri Kanker", Penerbit ITB, Bandung, 3.
5. Mutschlerm, E., (1991), "Dinamika Obat", Buku Ajar Farmakologi danb Toksikologi, Edisi Kelima, Penerbit ITB, Bandung, 700.
6. Tjay, H.T., Rahardja, K., (1986), "Obat-Obat Penting", Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya, Edisi Keempat, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 154.
7. Mursito, B., (2000), "Tampil Percaya Diri Dengan Ramuan Tradisional", Penerbit PT. Penebar Swadaya, Jakarta, 4.
8. Waha, G.M., (2000), "Sehat Dengan Mengkudu", Penerbit MSF Group, Jakarta, 5, 10, 17, 18, 35.

9. Mayer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen., Nichols, D.E., and Mc. Laughlin, J.L., (1982), "Brine Shrimp, a Convenient General Bioassay For Active Plant Constituent", *Planta Med*, 31-34.
10. Anderson, J.E., Goetz, C.M. dan Mc. Laughlin, J.L., (1991), "A Blind Comparison of Simple Bench-Top Bioassay and Human Tumor Cell Cytotoxicities as antitumor Prescreens", *Phytochem, Anal.*, Volume 2, 107-110.
11. Departemen Kesehatan Republik Indonesia (1985), "Tanaman Obat Indonesia," Jilid I, Jakarta, 61 - 62.
12. Tjitrosoepomo, G., (1994), "Taksonomi Tumbuhan Obat-Obatan", Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 131, 304, 364.
13. Benson.L., (1957), "Plant Classification", D.C. Helth and Company, Boston. 2, 3, 109, 113, 286.
14. Wijayakusuma, H.M.H., dkk, (1996), "Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia", Jilid IV, Penerbit Pustaka Kartini, Jakarta, 110, 112.
15. Heyne, K., (1987), "Tumbuhan Berguna Indonesia". Jilid III, Terjemahan Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Departemen Kehutanan Republik Indonesia, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, 1795-1799.
16. Wijayakusuma, H.M.H., (2001), "Penyembuhan dengan Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)", Penerbit Milenia Populer, Jakarta, 12-15, 55-56.
17. Mujiman (1998), "Udang Renik Air Asin", Bharatara Karya Aksara, Jakarta, 15-25.

18. Steven M., Colegate and Russell, J., Molyneux, (1993), "Bioactive Natural Products, Detection, Isolation and Struktural-Determination", CRC Press, Inc., London, 442-451.
19. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, (1995), "Farmakope Indonesia", Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. 14.
20. Ansel C., H., (1989), "Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi", Edisi Keempat Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, 201, 207.
21. Doerge, F. Robert., (1982), "Buku Teks Wilson dan Eisvold Kimia Farmasi dan Medisinal Organik", terjemahan oleh Drs. A. Mustafa Fatah, Apt. SU, Edisi Kelima, Jilid 2, Institut Pertanian Bogor, Penerbit Erlangga, Jakarta, 418-424.
22. Kinbal, J.W. (1988), "Biologi", terjemahan oleh H. Siti Soetarni T., Edisi Kelima. Jilid 2, Institut Pertanian Bogor, Penerbit Erlangga, Jakarta, 418-424.
23. Siswandono., B Soekardjo., (1995), "Kimia Medisinal", Airlangga University Press, Surabaya. 407-410.