

# Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

**Dede Sukandar\*, S. Hermanto, Emi Lestari**

Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi  
UIN Syarif Hidayatullah Jakarta,  
Jalan Ir. H. Juanda No 95 Ciputat 15412 Indonesia  
email: ds\_tea2007@yahoo.com

## Abstrak

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui toksisitas dari ekstrak daun pandan wangi menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan tiga macam pelarut, yaitu butanol, etil asetat, dan petroleum eter. Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam. Efek toksik masing-masing ekstrak diidentifikasi dengan presentase kematian larva udang menggunakan analisis probit ( $LC_{50}$ ). Ekstrak aktif kemudian diuji kandungan fitokimianya dan senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya dengan menggunakan GC-MS. Hasilnya menunjukkan ekstrak etil asetat bersifat toksik ( $LC_{50}$  : 288,4 ppm). Senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat adalah senyawa terpenoid dan steroid.

**Kata kunci** : Ekstrak Daun Pandan Wangi, BSLT, *Artemia salina* Leach,  $LC_{50}$ , Fitokimia, GC-MS

## Abstract

An investigation to find out the toxicity of tray screw pine leaf extract has been done by using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. Fragrant screw pine leaf extract was made by macerating with three kinds of solvent, i.e. butanol, ethyl acetate, and ether petroleum. Toxicity was conducted for prawn larva *Artemia salina* Leach of 48 hours age. Effect of toxicity from each extract identified with presentage of death of prawn larva and counted by probit analysis ( $LC_{50}$ ). An active extract then characterized by phytochemistry content and bioactive compound by GC-MS analysis. The result showed that ethyl acetate extract was more toxic than another extract ( $LC_{50}$  : 288,4 ppm). Futhermore, the bioactive compound of tray screw pine leaf was probably to be either terpenoid and steroid compound.

**Keywords** : Fragrant Screw Pine Leaf Extract, BSLT, *Artemia salina* Leach, Phytochemistry, GC-MS,  $LC_{50}$

## 1. PENDAHULUAN

Bahan-bahan hayati telah digunakan oleh manusia untuk memenuhi berbagai keperluan hidup. Indonesia yang beriklim tropis memiliki sumber daya alam hayati yang sangat beranekaragam. Tumbuh-tumbuhan hutan tropik Indonesia memiliki peranan dalam era teknologi yang tidak kalah penting dengan sumber daya alam lainnya seperti gas, batu bara, mineral, dan lain-lain.

Dari segi kimia, sumber daya alam hayati ini merupakan sumber senyawa kimia yang tak terbatas jenis maupun jumlahnya.

Dengan demikian keanekaragaman hayati dapat diartikan sebagai keanekaragaman kimiawi yang mampu menghasilkan bahan-bahan kimia, baik untuk kebutuhan manusia maupun organisme lain seperti untuk obat-obatan, insektisida, kosmetika, dan sebagai bahan dasar sintesa senyawa organik yang lebih bermanfaat (Achmad, 1985).

Pengobatan secara tradisional sebagian besar menggunakan ramuan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan baik berupa akar, kulit batang, kayu, daun, bunga, atau bijinya. Agar pengobatan secara tradisional dapat dipertanggungjawabkan maka

diperlukan penelitian ilmiah seperti penelitian di bidang farmakologi, toksikologi, identifikasi, dan isolasi zat kimia aktif yang terdapat dalam tumbuhan.

Salah satu tumbuhan yang banyak digunakan sebagai obat tradisional adalah pandan wangi, dengan nama ilmiah *Pandanus amaryllifolius* Roxb, termasuk genus pandanus dari suku Pandanaceae. Daun pandan wangi sering digunakan sebagai bahan penyedap, pewangi, dan pemberi warna hijau pada masakan. Selain itu juga berkhasiat untuk menghitamkan rambut, menghilangkan ketombe, rambut rontok, lemah saraf, tidak nafsu makan, rematik, sakit disertai gelisah, serta pegal linu (Dalimartha, 2002).

Daun pandan wangi mengandung alkaloid, saponin, flavonoida, tanin, polifenol, dan zat warna (Sugati dan Jhonny, 1991). Komposisi utama yang menyebabkan aroma pada pandan wangi tidak diketahui dengan pasti. Kemungkinan senyawa utama penyusun aroma pada daun pandan wangi adalah 2-acetyl-1-pyrroline (2AP)(Buttery, 1983)

Sebuah penelitian (Sukandar, 2007) melaporkan tumbuhan pandan wangi memiliki beberapa senyawa kimia yang menjadi komponen penyusun minyak atsiri daun pandan wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) yaitu : 3-alil 6-metoksi fenol, 3-metil 2 (5H) furanon, dietil ester 1,2-benzenadikarboksilat, dan 1,2,3-propanetiril ester asam dodekanoat.

Uji pendahuluan senyawa aktif pada ekstrak tanaman biasanya dilakukan dengan hewan uji. Salah satu hewan uji yang sesuai adalah *brine shrimp* (udang laut) *A. salina* Leach, sejenis udang-udangan primitif dan pertama kali ditemukan di Lymington, Inggris pada tahun 1755 dan termasuk famili *crustaceae* tingkat rendah dari *phylum arthropoda* (Purwakusuma, 2007).

*Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pertama kali diperkenalkan oleh Michael, dkk pada tahun 1956. Metode pengujian ini didasarkan pada bahan senyawa aktif dari tumbuhan yang bersifat toksik dan mampu membunuh larva *A. salina* Leach. dan dapat digunakan sebagai uji praskrining aktivitas antikanker (Meyer et al, 1982).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui toksisitas pandan wangi terhadap larva udang *A. salina* Leach melalui uji BSLT sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui senyawa bioaktif dari pandan wangi.

## 2. METODE PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Sampel daun pandan wangi (*P. amaryllifolius* Roxb.) dikumpulkan dari Kelurahan Beji Timur, Kecamatan Beji, Depok. Identitas biologi ditentukan di Botani Herbarium Bogoriense, Cibinong dan spesimennya disimpan di herbarium tersebut. Larva *A. salina* Leach berasal dari Laboratorium Kimia LIPI, Serpong.

Bahan untuk ekstraksi terdiri dari n-butanol, etil asetat dan petroleum eter, sedangkan untuk uji toksisitas menggunakan DMSO (Dimetilsulfoksida).

Identifikasi ekstrak aktif dilakukan dengan GC-MS 6890 N-5973 Agilent dengan kolom (HP-5, 0.25 mm \* 30 m \* 0.25 µm).



Gambar 1. Tumbuhan Pandan Wangi

### Ekstraksi

Sebanyak 25 g daun pandan wangi yang telah dikeringkan dan dihaluskan, dimaserasi dengan butanol, etil asetat, dan petroleum eter (3 x 24 jam). Setelah dilakukan penyaringan masing-masing ekstrak dipekatkan pada suhu 40–65 °C hingga diperoleh padatan gum berwarna hijau (ekstrak butanol 2,43 g, etil asetat 1, 71 g, dan petroleum eter 0, 66 g. Ketiga ekstrak kemudian diuji toksisitasnya dengan metode BSLT.

### Uji Toksisitas

Sebanyak 4 mg ekstrak sampel dilarutkan dalam 10 µL Dimetil Sulfoksida

(DMSO) 10 ppm dan ditambah pelarut air laut sampai 2 ml (2000 ppm) sebagai larutan A. Larutan A 8 mL dipipet dan ditambahkan pelarut sampai 10 mL (1600 ppm) sebagai larutan B. Larutan B 5 mL dipipet dan ditambahkan pelarut sampai 10 mL (800 ppm) sebagai larutan C. 5 mL larutan C dipipet dan ditambahkan pelarut sampai 10 mL (400 ppm) sebagai larutan D. 5 mL larutan E dipipet dan ditambahkan pelarut sampai 10 mL (200 ppm) sebagai larutan E. Selanjutnya, dari larutan A, B, C, D, E masing-masing dipipet sebanyak 100 µL lalu dimasukkan ke dalam microplate yang sudah ditera 200 µL. Setiap konsentrasi dibuat tiga kali pengulangan.

Ke dalam microplate berisi ekstrak dimasukkan 10 ekor larva *A. Salina* Leach yang berumur 48 jam. Sebagai kontrol, digunakan 10 ekor larva *A. Salina* Leach di dalam 200 µL air laut tanpa diberi ekstrak. Campuran dibiarkan selama 24 jam di bawah cahaya lampu neon 18 watt. Setelah 24 jam, larva udang yang mati dari masing-masing wadah dihitung. Nilai  $LC_{50x}$  ditentukan menggunakan analisis probit. Ekstrak yang memiliki toksisitas tertinggi kemudian diuji kandungan fitokimianya.

### Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan mengetahui kandungan alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid, dan saponin dalam ekstrak etil asetat daun pandan wangi, yang mempunyai efek biologi menghambat pertumbuhan kanker, mikroba, sebagai antioksidan, menurunkan kolesterol darah, dan kadar glukosa darah, bersifat antibiotik, serta menimbulkan efek

peningkatan kekebalan (Sumastuti, 2002). Identifikasi Flavonoid dilakukan dengan cara menambahkan serbuk Mg dan 2 ml HCl 2N pada 2 mL larutan ekstrak. Senyawa flavonoid akan menunjukkan warna jingga sampai merah. Identifikasi Alkaloid dilakukan dengan cara 3 ml larutan ekstrak ditambahkan dengan 1 ml HCl 2N dan 6 ml air suling, kemudian dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat diperiksa dengan pereaksi Dragendorff terbentuk endapan jingga, Wagner terbentuk endapan coklat, dan Mayer terbentuk endapan putih. Identifikasi Steroid dan Terpenoid dilakukan dengan pereaksi Lieberman-Burchard. Warna biru atau hijau menunjukkan steroid sedangkan warna merah menunjukkan terpenoid. Identifikasi Saponin dilakukan dengan penambahan metanol lalu dipanaskan selama beberapa menit. Kemudian dikocok vertikal selama 10 detik. Hasil uji positif jika timbul busa stabil selama beberapa menit (Harborne, 1987).

### Identifikasi GC-MS.

Ekstrak etil asetat yang memiliki toksisitas tertinggi diidentifikasi kandungan senyawanya menggunakan GC-MS dengan kondisi suhu oven (50°C - 290°C), *Interface* (290 °C), kontrol mode (split), tekanan (20.8 psi), total flow (23.7 ml/min), split ratio : (200 : 1), split flow (199 ml/min), gas (He), dan detector (MSD).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan praskrining terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam

**Tabel 1.** Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pandan Wangi dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Ekstrak	Konsentrasi (ppm)	Mortalitas (%)	$LC_{50}$ (ppm)	Keterangan
Butanol	800	25,71	8.511,38	Tidak toksik
	400	8,47		
	200	3,49		
	100	0		
Etil asetat	800	92,42	288,4	Toksik
	400	64,81		
	200	36		
	100	1,61		
Petroleum eter	800	11,76	912.010,84	Tidak toksik
	400	6,25		
	200	3,29		
	100	0		
Kontrol	0	0	0,00	-

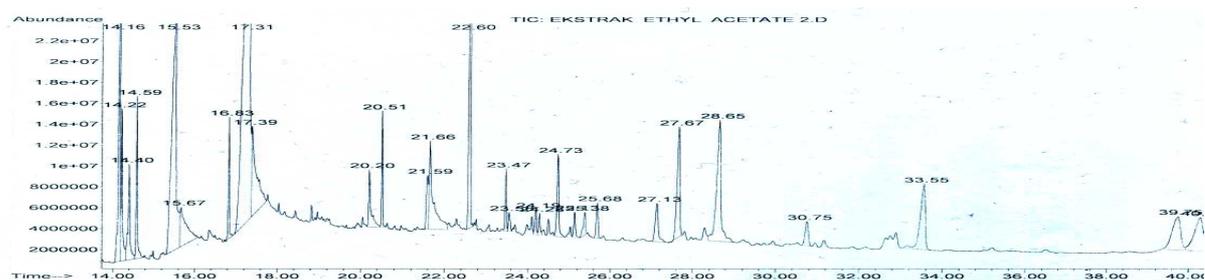
ekstrak tanaman. Suatu ekstrak dianggap toksik apabila memiliki nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm sedangkan untuk senyawa murni dikatakan toksik apabila  $LC_{50}$  nya  $< 200$  ppm (Meyer, dkk. 1982). Hasil uji toksisitas ekstrak butanol, etil asetat, dan petroleum eter daun pandan wangi dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) tertera pada Tabel 1.

Diantara ketiga ekstrak yang diuji, ekstrak etil asetat mempunyai  $LC_{50}$  sebesar 288,4 ppm atau kurang dari 1000 ppm. Hal ini menunjukkan ekstrak etil asetat bersifat toksik terhadap udang *A. salina* Leach.

Hasil kontrol dengan air laut (mortalitas 0 %), menunjukkan bahwa larva yang mati disebabkan senyawa toksik pada ekstrak, bukan karena faktor lainnya.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan adanya senyawa steroid (+), sedangkan senyawa terpenoid, alkaloid, flavonoid, dan saponin tidak terdapat (-) dalam ekstrak etil asetat.

Analisa dengan GCMS menunjukkan hasil sebagaimana terlihat pada Gambar 2.



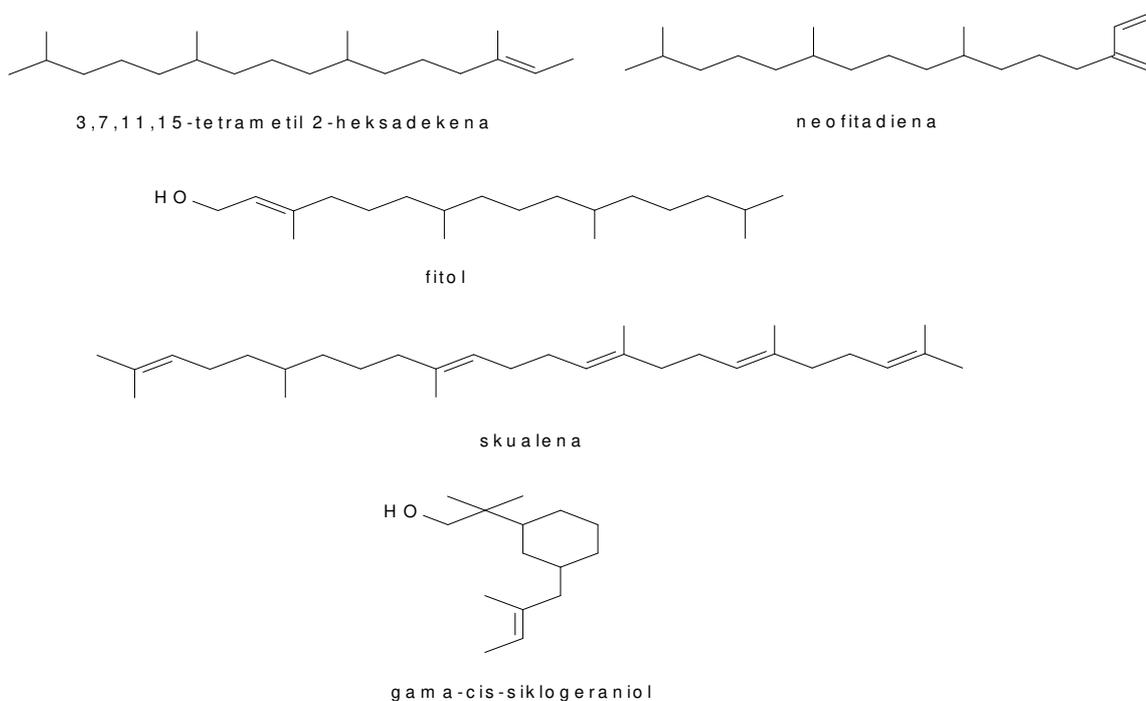
**Gambar 2.** Hasil analisa GCMS ekstrak etil asetat daun pandan wangi

**Tabel 2.** Senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat daun Pandan Wangi

Puncak	Waktu retensi (Rt)	Luas puncak	Kemiripan (%)	Kemungkinan nama senyawa
1	14,16	6,77	94	Neofitadiena
2	14,22	2,42	83	3,7,11,15- tetrametil-2 – heksadekena
3 dan 4	14,40 dan 14,59	2,09 dan 2,25	93	Neofitadiena
5	15,53	12,78	98	Asam Palmitat
6	15,67	2,41	90	Fitol
7 dn 8	16,83 dan 17,31	1,33 dan 25,65	90 dan 91	Metil Linolenat
9 dan 10	17,39 dan 17,52	3,08 dn 0,46	70 dan 95	Asam 9,12-oktadekadienoat
11	17,56	1,03	96	Asam Palmitat.β-monogliserida
12	20,20	0,82	68	Di-(2-etilheksil) pthalat
13	20,51	1,28	91	Etil Linolenat
14	21,60	0,98	93	Skualena
15	21,66	1,43	91	Solanesol
16	22,61	6,40	95	4β, 5β-kolestan 4,5-epoksi
17	23,47	0,94	94	Alpha. -(p-klorobenzoil)-p-kloro asetofenon
18	23,55	0,37	70	Gama. -cis-seskuisiklogeraniol
19	24,19	0,53	94	Gama. -tokoferol
20	24,28	0,42	76	3,5-dedihidro stigmastan -6,22-dien
21	24,73	1,81	98	Stigmastan-3,5-dien
22 dan 26	25,14 dan 27,67	0,52 dan 3,62	25 dan 95	Vitamin E
23	25,38	0,59	89	Kampesterol
24	25,68	0,76	96	Stigmastan-5,22-dien-3-ol,
25.	27,13	1,36	96	Gama. -sitosterol
27.	28,65	6,06	96	Neofitadiena
28.	30,75	0,89	97	Asam Linolenat
29.	33,55	3,35	94	1-metil-2,3-dihidro-10-
30.	39,75	3,46	55	Fenilimidazo[1,2-g]1,6] naphthiridin-
31.	40,29	4,16	83	5(1H)-on

Berdasarkan data di atas terdapat 4 golongan senyawa utama yang terkandung dalam ekstrak etil asetat, yaitu asam lemak (lemak), terpenoid, steroid, dan vitamin. Diantara senyawa-senyawa tersebut yang diduga bersifat toksik terhadap udang *A. salina* Leach adalah senyawa terpenoid dan steroid. Hal ini didasarkan pada laporan Indriyani, dkk.

2006, yang menyatakan bahwa ekstrak daun pecut kuda bersifat toksik terhadap larva *A. salina* Leach dan senyawa yang terkandung di dalamnya adalah senyawa terpenoid. Selain itu, senyawa terpenoid dikenal pula sebagai salah satu golongan senyawa kimia dalam tanaman yang memiliki aktivitas antikanker dan antioksidan (Lisdawati, 2002).

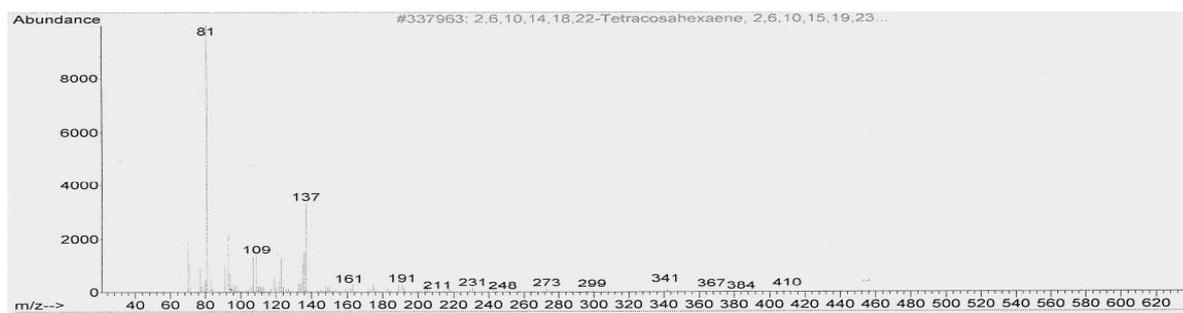


**Gambar 3.** Beberapa Senyawa Terpenoid dalam Ekstrak Etil Asetat Daun Pandan Wangi

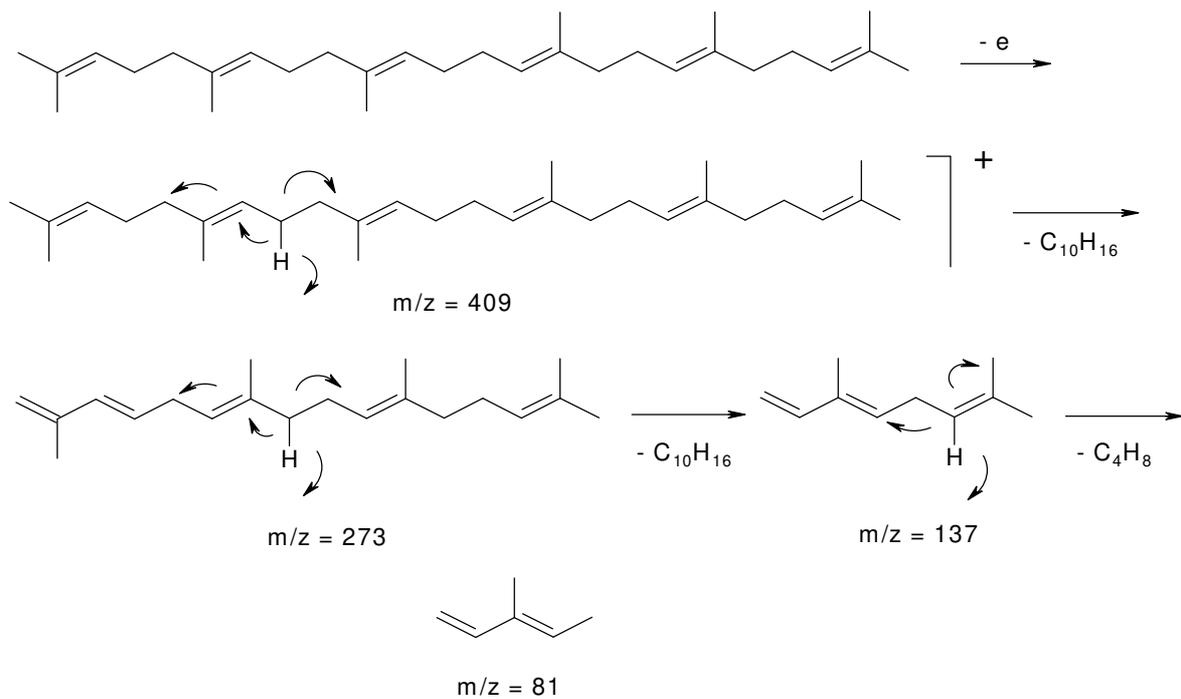
Senyawa terpenoid yang terdapat dalam ekstrak etil asetat meliputi neofitadiena, 3,7,11,15- tetrametil 2-heksadekena, fitol, skualena, dan gamma.-cis-seskuisiklogeraniol (Gambar 3). Pada skrining fitokimia, senyawa terpenoid tidak teridentifikasi, tetapi pada hasil analisa GC-MS menunjukkan adanya senyawa terpenoid. Hal ini terjadi disebabkan beberapa kemungkinan antara lain penggunaan pelarut yang sudah kadaluarsa atau konsentrasi

terpenoid yang sangat kecil sehingga tidak dapat teridentifikasi.

Berdasarkan analisa GC-MS, salah satu senyawa terpenoid yang diduga bersifat toksik terhadap udang *A. salina* Leach, yang memiliki waktu retensi 22,61, kualitas 98 % dan luas puncak 6,40 % adalah *skualena*. Senyawa ini bermassa molekul relatif ( $m/z$ ) 409 ( $M^{+1} = 410$ ) dengan rumus molekul  $C_{30}H_{49}$ . Spektrogram MS senyawa skualena tertera pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Spektrogram MS Senyawa Skualena

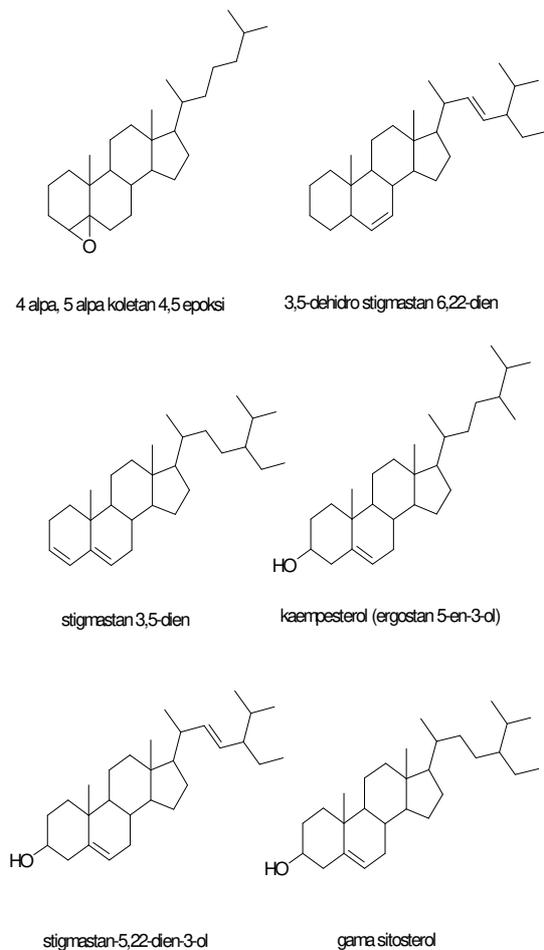


**Gambar 5.** Pola Fragmentasi Skualena yang Disarankan

Selanjutnya berdasarkan hasil penelitian Sukardiman (2004), senyawa steroid pada ekstrak metanol *Marchantia planiloba* Steph. mampu membunuh larva *A. salina* Leach dengan  $LC_{50}$   $247,10 \pm 5,28$   $\mu\text{g/ml}$ . Fitosterol yang juga dikenal sebagai sterol tumbuhan seperti stigmasterol, kampesterol, sitosterol, ergotamin (provitamin D) memiliki kemampuan untuk berkompetisi dengan kolesterol dalam penyerapannya di dalam usus. Kompetisi ini mengakibatkan berkurangnya jumlah kolesterol yang dapat diserap oleh tubuh (Ostlund, dkk. 2003). Selain itu, sterol juga dapat berperan dalam mencegah terjadinya kanker (De Stefani, dkk. 2000).

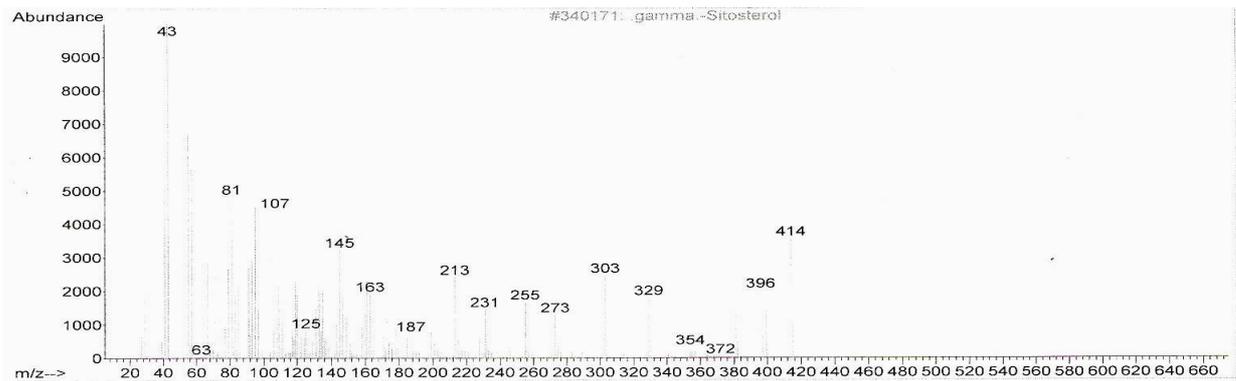
Senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak etil asetat antara lain solanesol,  $4\alpha$ ,  $5\alpha$ -kolestan 4,5-epoksi, 3,5-dedihidro stigmastan - 6,22-dien, , stigmastan-3,5-dien, kampesterol, stigmastan- 5,22-dien-3-ol, dan gamma-sitosterol (Gambar 6).

Hasil analisa GC-MS juga menunjukkan adanya salah satu senyawa steroid yang bersifat toksik terhadap udang *A. salina* Leach. yang berada pada waktu retensi 28,65, luas puncak 6,06 %, dan kualitas 96 % adalah senyawa *gamma-sitosterol*. Senyawa ini memiliki massa molekul relatif ( $m/z$ ) 414 ( $M^+ = 414$ ) sesuai dengan rumus molekul  $C_{29}H_{50}O$ .



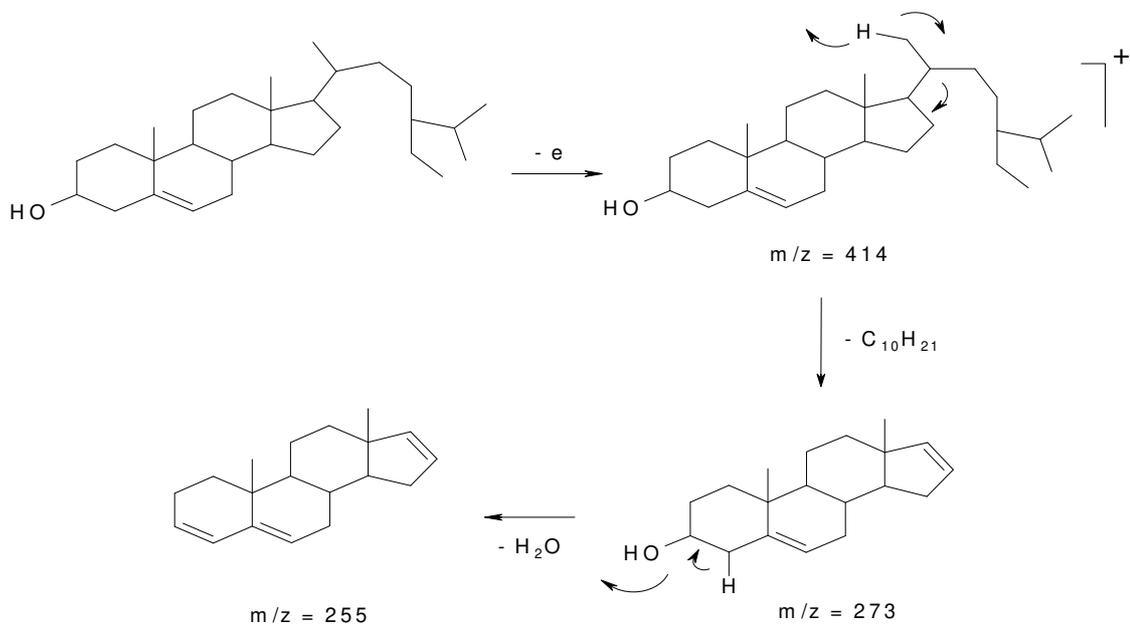
**Gambar 6.** Beberapa Senyawa Steroid dalam Ekstrak Etil Asetat Daun Pandan Wangi

Spektrogram MS senyawa gamma-sitosterol tertera pada Gambar 8 berikut ini.



Gambar 7. Spektrogram MS Senyawa gamma-sitosterol

Pola fragmentasi *gamma-sitosterol* yang terlihat pada gambar 8 di bawah ini. disarankan sesuai dengan hasil analisa MS



Gambar 8. Pola Fragmentasi gamma-sitosterol yang Disarankan

#### 4. KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu :

1. Ekstrak etil asetat daun pandan wangi bersifat toksik terhadap larva udang *A. salina* Leach. dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 288,4 ppm.
2. Golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat adalah senyawa terpenoid dan steroid.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada pimpinan dan staf Herbarium Bogoriense Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong Jawa Barat, yang telah membantu mengidentifikasi spesimen tumbuhan. Terima kasih pula kami sampaikan kepada Kepala Laboratorium Kimia-LIPI Serpong, yang telah membantu pengujian toksitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

## DAFTAR PUSTAKA

1. Achmad. S.A., (1986), *Kimia Organik Bahan Alam*. Universitas Terbuka, Jakarta.
2. Buttery, R. G., Ling, L. C., Juliano, B. O. and Turnbaugh, J. C., (1983), *Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline*. J.Agric. Food Chem., 31, 823–826.
3. Dalimartha, Setiawan, (2007), *Obat Tradisional, Pandan wangi (Pandanus amaryllifolius Roxb.)*. <http://www.pdpersi.co.id>. 13 April 2007.
4. De Stefani, Eduardo, et al., (2000), *Plant Sterols and Risk of Stomach Cancer: A Case-Control Study in Uruguay*. Nutrition and Cancer 37 (2): 140-144.
5. Harborne, J. B., (1987), *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua*. ITB, Bandung.
6. Indrayani, Lany. Hartati Soetjipto dan Lydia Sihasale, *Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (Stachytarpheta jamaicensis L. Vahl) Terhadap Larva Udang Artemia salina Leach*. Berk. Penel. Hayati: 12, (2006), 57–61.
7. Lisdawati, Vivi, (2007), *Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa). Toksisitas, Efek Antioksidan dan Efek Antikanker Berdasarkan Uji Penapisan Farmakologi*. <http://mahkotadewa.com/VFC/vivi.htm>. 17 September, 2007.
8. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J.E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E., and McLaughlin, J. L., (1982), *Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents*. Planta Medica, 45:31-34.
9. Ostlund RE, Racette, SB, and Stenson WF., (2003), *Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ*. Am J Clin Nutr 77 (6): 1385-1589.
10. Purwakusuma, Wahyu, (2007), *Artemia salina (Brine Shrimp)*. <http://www.o-fish.com/PakanIkan/artemia.php>. 30 Oktober 2007.
11. Sugati, S. dan Johnny, R.H., (1991), *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*. Badan Penelitian & Pengembangan Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
12. Sukandar, Dede, (2007), *Isolasi dan Penentuan senyawa kimia minyak atsiri tumbuhan pandan wangi ( P. amaryllifolius Roxb. )*. Prosiding Seminar BKS MIPA, UIN Syarif Hidayatullah, Jakarta, 42 : 53.
13. Sukardiman, Abdul Rahman, Nadia Fatma Pratiwi, (2004), *Uji Praskrining Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol Marchantia cf. planiloba Steph. Dengan Metode Uji Kematian Larva Udang dan Profil Densitometri Ekstrak Aktif*. Majalah Farmasi Airlangga, Vol.4 No.3
14. Sumastuti, R., Sonlimar, M., (2002), *Efek Sitotoksik Ekstrak Buah dan Daun Mahkota Dewa [Phaleria macrocarpa (Scheff) Boerl.] Terhadap Sel Hela*. Farmakologi Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.
15. Thomas TG, Rao S, Lal S., (2004), *Mosquito larvicidal properties of essential oil of an indigenous plant, Ipomoea cairica Linn*. Jpn J Infect Dis 57: 176-177.
16. WHO (2005), *Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides*. World Health Organization Communicable Disease Control, Prevention and Eradication WHO Pesticide Evaluation Scheme.
17. Yang YC, Lee SG, Lee HK, Kim MK, Lee SH, Lee HS., (2002), *A piperidine amide extracted from Piper longum L. fruit shows activity against Aedes aegypti mosquito larvae*. J Agric Food Chem. 50(13): 3765-3767.
18. Zulkifli N., (2005), *Proses pembuatan minyak jarak sebagai bahan bakar alternatif*. Laporan penelitian tim Departemen Teknologi Pertanian USU Medan.