

UJI TOKSISITAS EKSTRAK KULIT BATANG RENGAS (*Gluta renghas*) TERHADAP LARVA UDANG *Artemia salina*

Nursal, Sri Wulandari, dan Budi Syahputra Rio
e-mail: rio_syahputra10@yahoo.com, nurs_al@yahoo.com, wulandari_sri67@yahoo.co.id
phone: +6285363671525

Program Studi Pendidikan Biologi Jurusan PMIPA FKIP
Universitas Riau Pekanbaru 28293

ABSTRACT

This research was conducted on toxicity tests of rengas (*Gluta renghas*) bark extract to shrimp larvae *Artemia salina* in July to September 2015. This research aims to determine the toxicity of rengas (*Gluta renghas*) bark extract to shrimp larvae of *Artemia salina*. This research was carried out by experimental research using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method which consisted of 5 treatments and 3 replications. Parameters measured were the mortality of shrimp larvae *Artemia salina*. The data obtained and analyzed by probit analysis using regression equation. The results showed that the extract of bark rengas (*Gluta renghas*) is toxic to shrimp larvae of *Artemia salina*. It can be seen from the LC_{50} values of 599.79 ppm.

Key Words: Toxicity Test, Rengas (*Gluta renghas*), *Artemia salina*

PENDAHULUAN

Tumbuhan merupakan tempat terjadinya sintesis senyawa organik yang kompleks menghasilkan sederet golongan senyawa dengan berbagai macam struktur. Beberapa jenis tumbuhan yang tumbuh di daerah yang ekstrim masih belum diketahui kandungan metabolit sekunder, salah satunya adalah rengas (*Gluta renghas*) yang termasuk kedalam famili Anacardiaceae. Di Sumatera spesies ini selalu terdapat dalam jumlah banyak di sepanjang sungai dan anak sungai yang airnya tawar, yang sering dan untuk waktu lama airnya mengenangi tepi-tepinya, daerah yang terbaik baginya adalah tanah benam yang dangkal, yang tetap terendam air lama setelah air di sungai mencapai tinggi yang lazimnya lagi (Heyne, 1987). Kondisi daerah yang tergenang air ketika musim hujan menyebabkan pori-pori tanah tertutup oleh air sehingga terjadi kondisi anaerob. Rengas merupakan salah satu tumbuhan yang

mampu beradaptasi dengan kondisi tersebut (Anonimus, 2015).

Spesies ini dikenal karena getahnya sangat beracun yang dapat menyebabkan iritasi berat pada kulit dan dapat melumpuhkan orang. Berdasarkan studi pustaka, tumbuhan ini belum banyak diteliti. Penelitian sebelumnya pada getah rengas dilaporkan senyawa ursiol, rengol, glutarengol, laccol dan thitsiol. Penelitian pada kayu rengas dilaporkan senyawa golongan steroid, lipid, benzenoid dan flavonoid, sedangkan penelitian pada bagian tumbuhan lainnya seperti akar, buah, bunga, kulit batang dan lain-lain belum banyak dilaporkan (Anonimus, 2015).

Senyawa-senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui efek toksik dari senyawa-senyawa yang dihasilkan tersebut. Dalam melakukan uji toksisitas suatu senyawa biasanya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality*

Test (BSLT), dimana makhluk hidup yang biasa digunakan adalah *Artemia salina* yang merupakan udang-udangan primitif yang termasuk dalam Filum Arthropoda. Udang ini hidup sebagai plankton di perairan dengan kadar garam 5-150 ppm, dengan suhu sekitar 25-30° C, kadar oksigen 2-7 ppm dan pH 7,3-8,4 (Windy Astuti Tampungan dkk., 2011). Larva udang ini merupakan general bioassay sehingga semua zat dapat menembus masuk menembus dinding sel larva tersebut. Bioassay adalah suatu pengujian tentang toksisitas pada suatu produk dalam rangka pencarian produk alam yang potensial yang biasanya menggunakan makhluk hidup sebagai sampel (Frengki dkk., 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui toksisitas ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas*) terhadap larva udang *Artemia salina*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Riau pada bulan Juli-September 2015. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan perlakuan konsentrasi ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas*) terhadap larva udang *Artemia salina* dengan 5 perlakuan dalam 3 kali ulangan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat penumbuk, alat pemotong, oven, rotary evaporator, pemanas air (water bath), timbangan ohaus, vortex genie 2, erlenmeyer, corong, batang pengaduk, spatula, gelas ukur, gelas kimia, pipet tetes, plat tetes, tabung reaksi, kertas saring, dirijen, kain lap, saringan, tabung vial, aerator, lampu, gunting, alat tulis dan kamera. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kulit batang rengas (*Gluta renghas*), *Artemia salina*, etanol 96%, air laut, aquades, aluminium foil, kloroform, asam sulfat pekat, asetat anhidrat, logam Mg,

HCl pekat, HCl encer, dan reagen Dragendorff.

Persiapan Bahan

Sampel yang digunakan adalah kulit batang rengas (*Gluta renghas*) yang diambil di daerah sekitar hutan desa buluh cina. Kulit batang rengas (*Gluta renghas*) dibersihkan dari kotoran yang menempel setelah itu dikering anginkan selama lebih kurang 2 minggu pada tempat yang tidak terkena cahaya matahari secara langsung agar senyawa bioaktifnya tidak rusak. Setelah kering sampel tersebut kemudian ditumbuk hingga halus untuk mendapatkan serbuk yang bertujuan untuk mempermudah penetrasi pelarut pada saat ekstraksi.

Uji Fitokimia

Uji pendahuluan kandungan metabolit sekunder dilakukan secara kualitatif. Serbuk kulit batang rengas (*Gluta renghas*) ditambahkan etanol secukupnya dan dipanaskan dalam pemanas air, setelah itu disaring dan filtrat yang diperoleh ditambahkan air dan kloroform. Campuran dikocok beberapa menit dan dibiarkan hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan air digunakan untuk uji flavonoid dan saponin, sedangkan lapisan kloroform digunakan untuk uji steroid/terpenoid (Diski Rahman Hakim, 2014). Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan logam Mg dan HCL pekat ke dalam lapisan air. Jika menghasilkan larutan berwarna merah menandakan adanya senyawa flavonoid (Harborne, 1987). Uji saponin dilakukan dengan mengocok lapisan air tersebut. Jika menghasilkan busa yang stabil menandakan adanya saponin (Diski Rahman Hakim, 2014). Uji steroid/terpenoid dilakukan dengan menambahkan pereaksi Liebermann-Burchard (asetat anhidrat ditambah asam sulfat pekat) terhadap lapisan kloroform. Jika menghasilkan warna hijau-biru menandakan adanya steroid atau larutan berwarna ungu-merah menunjukkan adanya terpenoid (Harborne, 1987). Tes Dragendorf juga dapat dilakukan untuk mengetahui keberadaan alkaloid. Filtrat yang diperoleh

ditambahkan reagen dragendorf. Terjadinya endapan berwarna merah mengindikasikan adanya senyawa alkaloid (Tiwari *et al* dalam Prawirodiharjo., 2014).

Ekstraksi

Serbuk kulit batang rengas (*Gluta renghas*) yang diperoleh dimaserasi dengan etanol 96% selama 24 jam pada suhu kamar, kemudian disaring. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50° C sehingga diperoleh ekstrak kental. Pelarut yang masih tersisa diuapkan dengan menggunakan pemanas air (water bath) pada suhu 40° C sehingga diperoleh ekstrak kering. Untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan ekstrak tersebut diencerkan dengan etanol 96%.

Penetasan Telur *Artemia salina*

Penetasan telur *Artemia salina* dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA UR, dengan cara merendam sebanyak 3 gram telur *Artemia salina* dalam wadah berbentuk persegi yang berisi 2,5 L air laut. Wadah dibagi menjadi dua bagian menjadi bagian gelap dan bagian terang dengan pembatas yang sudah dilapisi aluminium foil. Telur dimasukkan ke bagian gelap yang tidak terkena cahaya lampu dan ditutup dengan aluminium foil. Bagian terang diberi cahaya lampu dan aerasi. Hal ini sesuai menurut Harefa (1997) dimana tingkat kepadatan optimal adalah sekitar 2-5 gr/l air. Sebagai media tetas digunakan air laut dengan salinitas antara 10-30 ppt. Kemudian telur tersebut dibiarkan selama 48 jam sampai telur menetas menjadi bentuk larva (nauplius).

Pengujian terhadap Larva Udang *Artemia salina*

Larutan uji ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas*) dibuat dengan cara menimbang 20 mg ekstrak kemudian dilarutkan dengan 2 mL etanol 96% sebagai larutan induk 10.000 ppm. Masing-masing

vial uji dikalibrasi sebanyak 5 mL. Larutan uji dibuat seri konsentrasi akhir menjadi 0 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1.000 ppm dengan pengenceran bertingkat dan pengulangan masing-masing tiga kali. Hal ini sesuai dengan Made Rai Rahayu, dkk (2013) bahwa konsentrasi ekstrak dibuat 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm dan 0 ppm sebagai kontrol tanpa penambahan ekstrak. Sampel dibiarkan menguap hingga mengering kemudian ke dalam masing-masing vial ditambahkan 1 tetes larutan DMSO. Selanjutnya vial diputar menggunakan vortex genie 2 sehingga larutan menjadi homogen dan ditambahkan dengan sedikit air laut.

Pengujian toksisitas larutan dilakukan dengan mengambil 10 ekor larva udang *Artemia salina* menggunakan pipet tetes dan dimasukkan ke dalam vial uji dengan berbagai konsentrasi kemudian ditambahkan air laut sampai batas kalibrasi. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dari masing-masing vial uji. Hal ini sesuai menurut Juniarti dkk dalam Prawirodiharjo (2014), untuk kontrol dilakukan tanpa penambahan sampel. Larutan dibiarkan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati dan masih hidup dari tiap tabung.

Analisis Data

Parameter dalam penelitian ini adalah jumlah kematian larva *Artemia salina* dari masing-masing konsentrasi dalam vial uji. Data dianalisis untuk memperoleh persentase mortalitas kumulatif dengan rumus:

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Rata-rata Akumulasi mati}}{\text{Akumulasi mati+akumulasi hidup}} \times 100\%$$

Dari hasil tersebut diketahui nilai probit dalam tabel nilai probit kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi untuk menghitung nilai LC₅₀. LC₅₀ adalah suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat mengakibatkan kematian organisme sampai 50% (Ismail dkk dalam Tri Atmoko dan Amir Ma'ruf., 2009). Suatu fraksi atau ekstrak dikatakan aktif bila

mempunyai nilai $LC_{50} \leq 1000$ $\mu\text{g/ml}$. Untuk senyawa murni dikatakan aktif bila mempunyai nilai $LC_{50} \leq 200$ $\mu\text{g/ml}$ (Alam dalam Frengki dkk., 2014). Nilai LC_{50} ditentukan secara statistik melalui persamaan regresi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Fitokimia Kulit Batang Rengas (*Gluta renghas*)

Tabel 1. Hasil Analisis Fitokimia Kulit Batang Rengas (*Gluta renghas*)

No	Golongan Senyawa	Pereaksi	Hasil
1	Flavonoid	Mg, HCl	+
2	Saponin		-
3	Terpenoid	Liebermann-Burchard	+
4	Steroid	Liebermann-Burchard	-
5	Alkaloid	Dragendorff	+

(+) : Memiliki kandungan senyawa

(-) : Tidak memiliki kandungan senyawa

Hasil uji fitokimia kulit batang rengas (*Gluta renghas*) seperti yang terlihat pada Tabel 1 diatas menunjukkan bahwa adanya kandungan senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, terpenoid dan alkaloid. Hasil positif terhadap flavonoid pada penelitian ini ditandai dengan adanya larutan merah pada pereaksi Mg, HCl. Senyawa flavonoid dapat menghasilkan warna merah, kuning atau jingga ketika tereduksi dengan Mg dan HCl (Harborne, 1987). Adanya terpenoid ditandai dengan terbentuknya warna ungu-merah pada pereaksi Liebermann-Burchard. Senyawa terakhir yang positif pada penelitian ini adalah alkaloid, ditandai dengan adanya endapan berwarna merah pada pereaksi Dragendorff. Alkaloid beracun bagi manusia dan banyak mempunyai kegiatan fisiologis yang menonjol sehingga dapat digunakan secara luas dalam bidang pengobatan (Harborne, 1987).

Pada penelitian ini seperti yang terlihat pada Tabel 1 diatas menunjukkan bahwa tidak terdapat kandungan saponin dan steroid pada ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas*). Hasil negatif terhadap saponin ditandai dengan tidak adanya busa

Pengujian telah dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA UR terhadap kandungan metabolit sekunder dari kulit batang rengas (*Gluta renghas*). Senyawa-senyawa yang diuji adalah flavonoid, saponin, terpenoid, steroid dan alkaloid. Hasil pengujian kandungan metabolit sekunder dari kulit batang rengas (*Gluta renghas*) dapat dilihat pada Tabel 1.

yang stabil pada saat pengocokan, sedangkan hasil negatif terhadap steroid ditandai dengan tidak adanya warna hijau-biru pada pereaksi Liebermann-Burchard.

Ekstraksi Kulit Batang Rengas (*Gluta renghas*)

Sebanyak 1500 gram serbuk kering kulit batang rengas (*Gluta renghas*) dimaserasi dengan etanol 96% selama 24 jam dalam suhu kamar. Hal ini dilakukan untuk melarutkan senyawa-senyawa polar dan nonpolar yang terdapat pada serbuk kulit batang rengas (*Gluta renghas*). Maserat yang sudah disaring kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 50°C , sehingga diperoleh ekstrak total etanol 96% kulit batang rengas (*Gluta renghas*) berwarna coklat kehitaman sebanyak 19,23 gram.

Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas telah dilakukan terhadap larva udang *Artemia salina* dengan menggunakan

ekstrak etanol 96% dari kulit batang rengas (*Gluta renghas*) untuk menentukan nilai LC_{50} . Pengujian toksisitas dilakukan dengan cara menghitung jumlah larva udang *Artemia salina* yang mati pada masing-masing perlakuan. Dari hasil penelitian ditemukan bahwa semakin besar nilai konsentrasi ekstrak, mortalitas pada larva udang *Artemia salina* juga semakin besar. Hal ini sesuai dengan Harborne (1987), yang menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka sifat toksiknya akan semakin tinggi.

Larva udang *Artemia salina* dalam tabung percobaan yang diberi perlakuan mengalami kematian, sedangkan larva udang *Artemia salina* yang berada dalam tabung percobaan 0 ppm (kontrol) tidak memberikan kematian sama sekali dalam selang waktu 24 jam. Hal ini membuktikan bahwa larva udang *Artemia salina* yang mati disebabkan oleh sifat toksik dari ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas*). Hasil toksisitas dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Batang Rengas (*Gluta renghas*)

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva tiap uji	Jumlah larva yang mati				Persen kematian (%)	Nilai probit	Log Konsentrasi
		1	2	3	Rata-rata			
1	10	1	1	1	1	10	3,718	0
10	10	3	2	2	2,333	23,33	4,261	1
100	10	4	4	3	3,667	36,67	4,668	2
1000	10	6	5	5	5,333	53,33	5,075	3
$LC_{50} = 599,79$ ppm								

Batang rengas (*Gluta renghas*) pada konsentrasi 1000, 100, 10, 1 dan 0 ppm sebagai kontrol terhadap larva udang *Artemia salina* yang dianalisis dengan metode analisis probit menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit batang rengas (*Gluta renghas*) memiliki kemampuan toksik yang dapat membunuh larva udang *Artemia salina* dengan nilai LC_{50} sebesar 599,79 ppm. Hal tersebut berkaitan dengan ketiga senyawa yang berhasil diidentifikasi secara kimia yang terdapat dalam ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas*) yaitu golongan flavonoid, terpenoid dan alkaloid. Senyawa metabolit yang menyebabkan kematian larva udang *Artemia salina* adalah senyawa golongan flavonoid dan alkaloid. Hal ini sesuai menurut Scheuer dalam Sandriani A Oratmangun, dkk (2014) yang mengatakan bahwa senyawa fitokimia yang memberikan efek toksik yaitu flavonoid, dimana pada kadar tertentu memiliki potensi toksisitas akut. Adanya flavonoid dalam lingkungan sel, menyebabkan gugus OH- pada flavonoid

berikatan dengan protein integral membran sel. Hal ini menyebabkan terbundungnya transport aktif Na^+-K^+ . Transpor aktif yang berhenti menyebabkan pemasukan ion Na^+ yang tidak terkendali ke dalam sel, hal ini menyebabkan pecahnya membran sel. Pecahnya membran sel inilah yang menyebabkan kematian sel.

Mekanisme kematian larva juga berhubungan dengan fungsi senyawa alkaloid dalam ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas*) yang dapat menghambat daya makan larva udang *Artemia salina*. Hal ini sesuai menurut Cahyadi dalam Sandriani A Oratmangun, dkk (2014) mengatakan bahwa cara kerja senyawa alkaloid adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa, sehingga tidak mampu

mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Ekstrak kulit batang rengas (*Gluta renghas*) memiliki sifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* dengan nilai LC₅₀ sebesar 599,79 ppm.

Melakukan pengujian terhadap nilai ED₅₀ untuk mengetahui dosis yang efektif untuk kepentingan yang lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2015. *Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder Rengas (Gluta renghas)*. <http://jurnalkimia.blogspot.com/2009/03/gallokatekin-senyawa-flavonoid-lainnya.html> (Diakses pada tanggal 6 maret 2015).
- _____. 2015. *Rengas (Gluta renghas)*. http://balittra.litbang.pertanian.go.id/index.php?option=com_content&view=article&id=1281&Itemid=10(Diakses pada tanggal 6 maret 2015).
- _____. 2015. *Senyawa Metabolit Sekunder Kulit Batang Rengas (Gluta renghas)*. <https://industri17agus.wordpress.com/2010/12/04/gallokatekinsenyawaflavonoid-lainnya-dari-kulitbatang-rengas-gluta-rengas-linn/> (Diakses pada tanggal 6 maret 2015).
- Ariza Zakiah Imani. 2014. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida* L) terhadap *Candida albicans* secara In Vitro. *Skripsi*. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura Pontianak (Diakses pada tanggal 20 november 2015).
- Diski Rahman Hakim. 2014. Isolasi dan Uji toksisitas Senyawa Alkaloid dari Kulit Batang Tumbuhan *Polyalthia rumphii* (B) Merr.(Annonaceae). *Skripsi*. Program Studi Kimia FMIPA UR.
- Frengki, Roslizawaty dan Desi Pertiwi. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Sarang Semut Lokal Aceh (*Mymercodia sp*) dengan Metode BSLT terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Medika Veterinaria Vol. 8 No. 1. 2014*. Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh (Diakses pada tanggal 23 februari 2015).
- Harborne, J.D. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*.ITB. Bandung.
- Harefa, F. 1997. *Pembudidayaan Artemia untuk Pakan Udang dan Ikan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia (Terjemahan) Jilid II*. Badan Litbang Kehutanan. Jakarta.
- Hurri Inayati. 2007. Potensi Antibakteri Ekstrak Daun Kedondong Bangkok (*Spondias dulcis* Forst). *Skripsi*. Program Studi Biokimia FMIPA ITB Bogor (Diakses pada tanggal 20 november 2015).
- Made Rai Rahayu, James Sibarani, dan I Made Dira Swantara.2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Ekstrak Etanol Spons *Callyspongia aerizusa* terhadap Larva *Artemia salina*. *Cakra kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry) Volume 1, Nomor 1*. Program Magister Kimia Terapan, Universitas Udayana, Bali.
- Prawirodiharjo, E. 2014. Uji Aktivitas Aantioksidan Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 70% Dan Ekstrak Air Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*). *Skripsi*. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.

- Sandriani A. Oratmangun, Fatimawali, dan Widdhi Bodhi. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) terhadap *Artemia salina* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) sebagai Studi Pendahuluan Potensi Anti Kanker. *Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT Vol. 3 No. 3. 2014*. Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115 (Diakses pada tanggal 23 januari 2015).
- Tri Atmoko dan Amir Ma'ruf. 2009. Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Ekstrak Tumbuhan Sumber Pakan ORANGUTAN terhadap Larva *Artemia salina* L. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam Vol. VI No. 1 : 37-45*. 2009. Balai Penelitian Teknologi Perbenihan Samboja Kalimantan Timur (Diakses pada tanggal 23 february 2015).
- Windy Astuti Tampungan, Herny I.E. Simbala, Edwin de Queljoe dan Stenly Wullur. 2011. Uji Toksisitas Ekstrak Batang Pinang Yaki (*Areca vestiaria*) pada *Artemia salina* Leach. *Jurnal Bioslogos, Vol. 1 No. 1. 2011*. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sam Ratulangi Manado, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado (Diakses pada tanggal 23 february 2015).
- Yustina. 2010. *Modul Pembelajaran*. FKIP Universitas Riau. Pekanbaru.

