

**ISOLASI DAN UJI SITOTOKSIK SENYAWA ALKALOID MAHKOTA DEWA
(*Phaleria macocarpa*) PADA KULTUR SEL KANKER PAYUDARA (T47D)**

***ISOLATION AND ALKALOID CYTOTOXIC ACTIVITY FROM MAHKOTA
DEWA (Phaleria macrocarpa) ON BREAST CANCER CULTURE CELL (T47D)***

Titiek Sumarawati¹ dan Dina Fatmawati²

¹Bagian Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang

²Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang

ABSTRAK

Tanaman Mahkota Dewa (*Phaleria macocarpa*) telah banyak digunakan masyarakat Indonesia sebagai tanaman obat tradisional, mempunyai banyak manfaat salah satunya adalah sebagai obat anti kanker, yang menghambat pertumbuhan massa tumor payudara. Buah *P. macrocarpa* banyak mengandung senyawa aktif yaitu alkaloid, saponin, flavonoid dan polifenol. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi senyawa alkaloid ekstrak mahkota dewa dan mengetahui efek sitotoksitas alkaloid terhadap kultur sel kanker payudara (T47D). Metode ekstraksi yang digunakan adalah sokletasi dengan pelarut etanol 95 %, dilanjutkan fraksinasi, lalu dilakukan isolasi alkaloid dengan cara kromatografi kertas preparatif dan identifikasi secara kualitatif menghasilkan endapan warna coklat menunjukkan adanya alkaloid. Dilanjutkan uji sitotoksitas menggunakan metode MTT. Hasil penelitian terdapat senyawa alkaloid diidentifikasi dengan timbulnya endapan coklat pada pereaksi dragendroft dan mempunyai nilai Rf sebesar 0,61: 0,33: 0,51: 0,67 dengan pengembang n-heksan : kloroform (3:2) dan kloroform : methanol (1:1) nilai Rf sebesar 0,63 dan 0,75 pada pengembang senyawa alkaloid memiliki nilai IC₅₀ sebesar 18,84 µg/ml terhadap sel T47D sedangkan nilai IC₅₀ doxorubicin yaitu sebesar 11,14 µg/ml. Kesimpulan penelitian ini dapat dikatakan bahwa nilai Rf alkaloid mahkota dewa yang diperoleh sebesar 0,63 dan berpotensi toksik terhadap sel T47D.

Kata kunci: mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). Cytotoxic, breast cancer culture cell (T47D)

ABSTRACT

Mahkota Dewa (Phaleria macocarpa) is the Indonesian herbal medicine used for treating various disease including cancer. It has been shown to have an anticancer activity that inhibiting breast tumor mass. It has been shown to have a wide range of active compounds such as alkaloid, saponin, flavonoid, and polyphenol. This research aimed at isolating alkaloid of mahkota dewa and finding out its anticancer effect on breast cancer cell culture (T47D). In this study, sokletation was used for the extraction using 95% ethanol solvent followed by then fraxination. Isolasi have been done with thin layer chromatography and qualitative identification was done to identify the alkaloid indicated by brown pellet. MTT method was used to assess the cytotoxic effect on breast cell culture T47D. The result showed that alkaloid compound showed by the present of cloroform: methanol solvent (1:1) make brown spot on dragendorf reagen dan Rf value was 0.61: 0.33: 0.51: 0.67 in other wise with n-heksan: cloroform (3:2) solvent Rf value was 0.63 and 0.75. The Cytotoxicity effect of alkaloid on T47D cell has the IC₅₀ value of 18.84 µg/ml, than the IC₅₀ value for doxorubixin was 11.14 µg/ml. In conclusion, alkaloid of the mahkota dewa extract had been shown to have Rf value of 0.63 and was toxic to T47D cells.

Keyword: mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). Cytotoxic, breast cancer culture cell (T47D)

PENDAHULUAN

Kanker merupakan suatu penyakit neoplasma ganas yang mempunyai spektrum yang sangat luas dan kompleks. Berdasarkan data penyebab kematian di dunia tahun 2005, kanker merupakan penyebab kematian tertinggi kedua setelah penyakit kardiovaskular. Sampai sekarang hampir tidak ada kanker yang dapat sembuh dengan spontan dan bila kanker terus dibiarkan tumbuh akan berujung pada kematian penderitanya (Rasjidi, 2009). Penyakit kanker payudara merupakan penyebab kematian kedua akibat kanker pada wanita setelah kanker leher rahim dan merupakan kanker yang paling banyak dijumpai pada wanita. Data yang diperoleh dari *American Cancer Society* menyebutkan bahwa kurang lebih 40.190 kasus kematian kanker payudara terdeteksi pada tahun 2007 dan meningkat sekitar 30% dalam kurun waktu 25 tahun (Ferlay *et al.*, 2001 *cit* Rasjidi, 2009). Di Indonesia data statistik mengenai tingkat insidensi dan prevalensi kanker payudara yang ada masih terus harus dikembangkan (Tjindarbumi, 2002), berdasarkan data dari SIRS (Sistem Informasi Rumah Sakit) pada tahun 2007 kanker payudara menempati urutan pertama diantara kanker yang terjadi pada wanita sebesar 21,69% dan cenderung meningkat dari tahun 2004 sampai tahun 2007 (Rasjidi, 2009). Di Semarang kanker payudara menempati urutan kedua dengan tingkat insidensi 12,16% per tahun.

Tjindarbumi (2002) mengemukakan di Indonesia terdapat berbagai jenis terapi yang dilakukan untuk kanker diantaranya radioterapi (70%), pembedahan (20-25%), kemoterapi (5-10%) tetapi Meiyanto (2002) *cit* Hamid (2008) menyatakan bahwa pengobatan kanker tersebut hanya efektif untuk beberapa periode waktu saja dan bersifat merusak seluruh sel termasuk sel yang normal sekalipun. Beberapa strategi untuk memperlama usia harapan hidup dan mengurangi gejala, tetapi masih diperlukan terapi baru yang dapat menghilangkan tumor primer dan sekunder dengan pentargetan yang lebih efisien.

Pada umumnya tumor pada payudara bermula dari sel epitelial, sehingga kebanyakan kanker payudara dikelompokkan sebagai karsinoma (keganasan tumor epitelial). Sedangkan sarkoma, yaitu keganasan yang berangkat dari jaringan penghubung, jarang dijumpai pada payudara. Kanker payudara pada umumnya berupa *ductal breast cancer* yang invasif dengan pertumbuhan tidak terlalu cepat (Tambunan,

2003). Salah satu model sel kanker payudara yang banyak digunakan dalam penelitian adalah sel MCF7 dan sel T47D.

Sel kanker payudara T47D merupakan *continous cell lines* yang morfologinya seperti sel epitel yang diambil dari jaringan payudara seorang wanita berumur 54 tahun yang terkena *ductal carcinoma*. Sel ini dapat ditumbuhkan dengan media dasar penumbuh RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640. Untuk memperoleh media kompleks, maka ditambahkan 0,2 U/ml bovine insulin dan *Foetal Bovine Serum* (FBS) hingga konsentrasi akhir FBS dalam media menjadi 10%. Sel ditumbuhkan pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5%. Sel ini termasuk *cell line adherent* (ATCC, 2008a) yang mengekspresikan ER-β (Zampieri *dkk.*, 2002) dibuktikan dengan adanya respon peningkatan proliferasi sebagai akibat pemaparan 17β-estradiol (Verma *dkk.*, 1998). Sel ini memiliki *doubling time* 32 jam dan diklasifikasikan sebagai sel yang mudah mengalami diferensiasi karena memiliki reseptor estrogen + (Wozniak and Keely, 2005). Sel ini sensitif terhadap doxorubicin (Zampieri *dkk.*, 2002) dan mengalami missense mutation pada residu 194 (dalam zinc binding domain L2) gen p53. Loop L2 ini berperan penting pada pengikatan DNA dan stabilisasi protein. Jika p53 tidak dapat berikatan dengan response element pada DNA, kemampuannya untuk regulasi *cell cycle* dapat berkurang atau hilang (Schafer *et al.*, 2000).

Pengembangan obat antikanker baru sebagai agen-agen kemoterapi kanker terus dikembangkan, evaluasi preklinik merupakan salah satu hal yang penting untuk mengetahui potensi aktivitas neoplastiknya. Evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis disebut uji sitotoksitas. Saat ini penggunaan kultur sel untuk uji toksisitas seluler cenderung meningkat. Hal tersebut disebabkan karena kondisi lingkungan yang lebih mudah terkontrol sehingga mekanisme toksisitas dapat dipelajari secara efektif.

Salah satu tanaman yang mempunyai potensi sebagai antikanker adalah Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). Di Indonesia tanaman ini telah digunakan secara luas oleh masyarakat sebagai terapi obat tradisional dan mempunyai banyak manfaat. Berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan aktivitas biologi antikanker pada bagian buah tanaman lebih tinggi dibandingkan dengan bagian lain dari tanaman mahkota dewa (Lisdawati, 2009). Kandungan kimia pada tumbuhan Mahkota dewa mulai dari buah, biji, daun dan kulit buah mengandung alkaloid, terpenoid, poliphenol, saponin, resin,

lignan dan flavonoid (Lidaswati, 2002; Winarto, 2003). Penggunaan ekstrak etanol mahkota dewa pada kultur sel kanker serviks Ca Ski mempunyai nilai IC_{50} 86,28 μ g/ml. Dari uraian diatas maka perlu untuk mengeksplor senyawa aktif yang ada dalam mahkota dewa, salah satunya alkaloid.

Beljanski (1989) menyatakan bahwa senyawa alkaloid adalah suatu molekul nitrogen organik yang ada pada tanaman, bersifat basa, mempunyai kemampuan menghambat perkembangan sel kanker tanpa mengakibatkan kerusakan pada sel normal. Hambatan perkembangan tersebut diakibatkan karena adanya pembentukan kompleks alkaloid-kanker DNA yang membuat replikasi DNA sel kanker tidak terjadi. Sejauh ini penelitian ilmiah mengenai aktivitas sitostatika tanaman dan mekanisme antikanker secara seluler masih sedikit, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut sehingga memperoleh *lead compound* selektif yang berguna kearah optimalisasi sintesis (Lisdawati, 2009). Untuk itu, pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa alkaloid mahkota dewa dan uji sitotoksik pada kultur sel kanker payudara sebagai langkah awal eksplorasi antikanker payudara dari senyawa alkaloid mahkota dewa.

METODE PENELITIAN

Mahkota dewa diperoleh dari perkebunan milik perusahaan jamu di Jawa Barat, dan telah dijadikan simplisia, sel kanker payudara (T47D), larutan etanol 95 %, n.heksana p.a (Merck), etil acetat p.a (Merck), cholorofom p.a (Merck), diklometana p.a (Merck), Silica gel 60 (mesh 60 – 230 ASTM), kertas preparatif, *Phosphat buffer sallincine* (PBS), reagen MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide). Alat yang digunakan berupa soklet, *rotary evaporator vacum*, kromatografi kolom, Kromatografi Lapis Tipis, inkubator CO₂, *multiwell plate*, *tissue culture*, mikroskop, beker glass, gelas ukur , pipet.

Ekstraksi

500 gram buah mahkota dewa yang telah dikeringkan ditumbuk halus, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam alat ekstrasi yaitu soklet dan dilarutkan secara bertahap, dengan pelarut n. heksana, etil acetat, etanol dan air masing masing selama 3 kali 5 jam. Hasil ekstrak yang dipakai dalam penelitian ini adalah ekstrak etil acetat lalu di uapkan dalam *Rotary evaporator vacum* dan didapat larutan ekstrak kental lalu

ditimbang menghasilkan sebesar 21 g. Hasil ini kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi.

Fraksinasi ekstrak etyl acetat dengan kromatografi kolom

Hasil ekstrak etil acetat di fraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom menggunakan fase diam silica gel 60 dan fase gerak kloroform : metanol (1:1) menghasilkan 5 fraksi isolat kemudian dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis dengan cara kromatografi kertas. Masing masing fraksi ditotolkan pada kertas preparatif, dielusi menggunakan cairan pengembang I kloroform : metanol (1:1) dan cairan pengembang II n.heksan : chloroform (3 : 2). Kemudian diuji secara kualitatif dengan pereaksi Dragendorrf LP, jika terjadi endapan coklat maka simplisia mengandung alkaloid dan bila dengan pereaksi Mayer terbentuk endapan mengumpal berwarna putih atau kuning menunjukkan ada alkaloid. Hasil dari 5 fraksi hanya 2 fraksi yang positif.

Uji sitotoksisitas

Suspensi sel kanker (5×10^4 sel/ml) dimasukkan ke dalam mikrowell dan diinkubasi dengan satu seri konsentrasi ekstrak etanol buah Mahkota dewa (triplo) pada medium kultur (37°C , CO_2 5%) selama 24-48 jam. Pada akhir inkubasi, media kultur pada sel dibuang dan dicuci dengan PBS 1x kemudian ditambahkan MTT 100 mikroliter, termasuk untuk kontrol media. Sel yang telah diberi MTT diinkubasi selama 2-4 jam dalam inkubator (sampai terbentuk garam formazan). Setelah garam formazan jelas terbentuk, pada kultur sel ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,1N HCl diinkubasi pada tempat gelap semalam. Setelah kurang lebih 24 jam sel diperiksa di *elisa reader* dengan panjang gelombang 550 nm. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu, intensitas warna ungu yang terbentuk berbanding terbalik dengan jumlah sel yang mati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bagian buah dari mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang terlebih dahulu diekstrak dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Kemudian dilakukan ekstraksi bertingkat dengan masing masing pelarut dari non polar, semi polar dan polar yaitu meliputi pelarut n.heksana, etyl acetat, ethanol dan air

selama 3 kali 5 jam. Hasil yang diinginkan berasal dari ekstrak etyl acetat. Mengingat sifat dari alkaloid adalah senyawa basa, lalu dilakukan isolasi dan memurnikan. Hasil isolat didapat adalah senyawa alkaloid yang dilakukan dengan mengidentifikasi dengan timbulnya endapan coklat setelah diberi pereaksi dragendroft dilanjutkan dengan kromatografi Lapis Tipis dengan kertas preparatif didapat nilai Rf sebesar 0,61: 0,33: 0,51: 0,67 dengan pengembang kloroform : methanol (1:1) sedang elusi ke 2 di dapat nilai Rf sebesar 0,63 dan 0,75 dengan pengembang n-heksan :kloroform (3:2).

Uji sitotoksik senyawa alkaloid mahkota dewa dilakukan pada T47D *cell line* dengan doxorubicin sebagai kontrol positif. Prinsip pengujian sitotoksik pada penelitian ini digunakan metode MTT *assay*. Aktivitas dehidrogenasae mitokondria sel yang hidup akan mereduksi warna kuning MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide) membentuk warna ungu (Wallert, 2007). Absorbansi warna yang terbentuk dapat diukur secara kuantitatif dengan panjang gelombang 550 nm dengan menggunakan elisa reader. Reduksi tersebut terjadi hanya ketika enzim reduktase mitokondria aktif sehingga konversinya dapat langsung berhubungan dengan jumlah sel yang hidup. Efek sitotoksik ditunjukkan oleh nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% dari populasi sel. Suatu senyawa dikatakan memiliki efek sitotoksik signifikan jika mempunyai nilai IC₅₀ < 20µg/ml sesuai dengan garis panduan *American National Cancer Institute* (Itharat *et al.*, 2004).

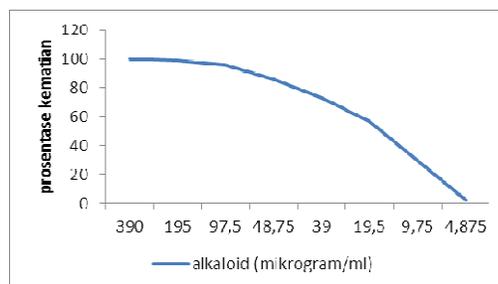
Hasil uji sitotoksisitas senyawa alkaloid mahkota dewa pada sel T47D tersaji pada **Tabel 1**. Hasil analisa probit diperoleh prosentase kematian tertinggi sebesar 100% pada konsentrasi 390 µg/ml dan terendah sebesar 2% pada konsentrasi 4,875 µg/ml. nilai IC₅₀ pada senyawa alkaloid terdapat pada 18,842 µg/ml.

Tabel 1. Rerata absorbansi kematian sel T47D setelah pemberian senyawa alkaloid *Phaleria macrocarpa*

Konsentrasi alkaloid µg/ml	Log konsentrasi	Rerata absorbansi	% inhibisi
390	2,591	0,0893	100
195	2,290	0,0957	99
97,5	1,989	0,1083	96
48,75	1,687	0,1547	86
39	1,591	0,2137	73
19,5	1,290	0,2847	57
9,75	0,989	0,406	30
4,875	0,688	0,5287	2

Keterangan: Absorbansi sel diukur dengan menggunakan elisa reader pada panjang gelombang 550 nm

Efektifitas senyawa alkaloid yang dapat menyebabkan sel mati dapat diperkirakan melalui kurva dosis respon (**Gambar 1**).



Gambar 1. Kurva respon dosis senyawa alkaloid terhadap kematian sel T47D

Persamaan grafik diatas adalah $Y = 5,2685x + 2$, dengan nilai R^2 sebesar 0,8879 menunjukkan terdapat hubungan yang erat antara dosis alkaloid dengan prosentase kematian sel T47D dimana semakin tinggi dosis semakin tinggi prosentase kematian sel. Uji aktivitas sitotoksik digunakan untuk mengetahui potensi senyawa alkaloid pada mahkota dewa terhadap kultur sel T47D yang merupakan model sel kanker payudara. Berdasarkan hasil perhitungan senyawa alkaloid mahkota dewa pada sel T47D diperoleh IC_{50} sebesar 2,42% (v/v). senyawa alkaloid memiliki kemampuan dalam menghambat replikasi DNA sel kanker dengan membentuk kompleks alkaloid-DNA kanker (Beljanski, 1982). Beermann (2006) menyebutkan bahwa efek ekstrak etanol mahkota dewa yang mempunyai kandungan alkaloid dapat menghambat aktivitas proliferasi sel dan diduga disebabkan karena adanya hambatan terhadap signal transduksi dan *cycle cell*. Tjandrawinata (2010) menyatakan bahwa ekstrak semi polar mahkota dewa mampu menginduksi apoptosis melalui penurunan ekspresi mRNA Bcl-2 pada sel MDA-MB-231 dan peningkatan ekspresi Bax. Peningkatan ekspresi Bax dapat menyebabkan meningkatnya permeabilitas membran pada mitokondria sehingga secara tidak langsung akan mengaktifkan caspase cascade pada jalur apoptosis intrinsik (Bruce, 2008).

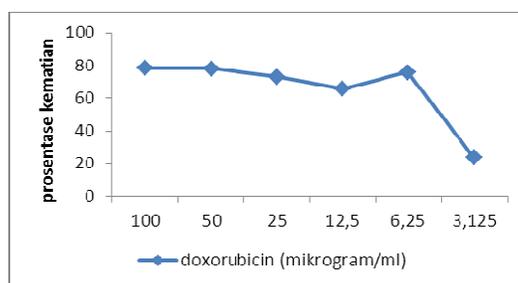
Doxorubicin merupakan agen sitotoksik yang digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini. Secara signifikan menyebabkan peningkatan prosentase jumlah sel yang mati (**Tabel 2**). Hasil analisa probit diperoleh prosentase kematian tertinggi sebesar 78,29% dengan konsentrasi terendah sebesar 23,56% pada konsentrasi 3,125 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} pada doxorubicin terdapat pada dosis 11,14 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 2. Rerata absorbansi kematian sel T47D setelah pemberian doxorubicin sebagai kelompok kontrol

Konsentrasi doxorubicin µg/ml	Log konsentrasi	Rerata absorbansi	% inhibisi
100	2	0,18833	78,29
50	1,698	0,190667	77,77
25	1,397	0,212	73,0052
12,5	1,096	0,244667	65,69
6,25	0,795	0,199667	75,76
3,125	0,494	0,433	23,56

Keterangan: Absorbansi sel diukur dengan menggunakan elisa reader pada panjang gelombang 550 nm

Grafik prosentase respon kematian sel T47D terhadap doxorubicin ditampilkan pada Gambar 2. Persamaan garis yaitu. $Y = 2,724x + 3,1702$ dengan nilai R^2 sebesar 0,5267 yang berarti terhadap hubungan yang cukup erat antara dosis dengan prosentase kematian sel T47D dimana semakin tinggi dosis maka semakin tinggi prosentase kematian sel.



Gambar 2. Kurva respon dosis doxorubicin terhadap kematian sel T47D

Doxorubicin adalah sejenis antibiotik golongan antracyclin yang sitotoksik, yang masih direkomendasikan sebagai *first line chemotherapy* pada kanker payudara. Senyawa ini mengandung rantai inti *naphtcenequinon* yang berikatan dengan gula amino (*danusamine*) melalui ikatan glikosidik pada cincin atom dan mempunyai respon yang baik bahkan mencapai 87 = 91 %. Senyawa ini dapat bereaksi dengan sitokrom P450 *reduktase* dan oksigen untuk menghasilkan *superoxide anion radical*, yang akhirnya akan merusak DNA (*deoxyribonucleic acid*) (Ashariati, 2007).

KESIMPULAN

Ekstrak etil acetat simplisia buah mahkota dewa positif mengandung alkaloid. Sistim kromatografi lapis tipis dengan kertas preparatif didapat nilai Rf sebesar 0,61: 0,33: 0,51: 0,67 dengan pengembang kloroform : methanol (1:1), sedang elusi ke 2 di

dapat nilai Rf sebesar 0,63 dan 0,75 dengan pengembang n-heksan :kloroform (3:2). Isolat alkaloid mahkota dewa bersifat sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC₅₀ alkaloid mahkota dewa sebesar 18,84 µg/ml dan nilai IC₅₀ kelompok kontrol doxorubicin sebesar 11,14 µg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashariati, Ami, 2007, Ekspresi Her-2/neu dan mdr-1 berkorelasi dengan dengan gen MDR-1 pada penderita kanker payudara “locally Advanced” pasca Pengobatan antrasiklin. ADLND Digital Collection-GDL 4.0. Unair Surabaya.
- Beljanski Mirko and Moniquen S Beljanski, 1982. Selective Inhibition of in vitro Synthesis of Cancer DNA by Alkaloids of β -Carboline Class. *Pathobiologi*. Vol. 50. No.2
- Gibbs, J B. 2000. Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science* Vol 287. 1969-1973
- Hamid Iwan Sahrial, 2008. Histopatologi dan Aktivitas Proliferasi Sel Kelenjar Mammae Setelah Pemberian Ekstrak Rimpang Temu Putih *Curcuma zedoaria* dan Inisiasi DMBA (Dimethylbenz(a)antrasen) pada Tikus Galur Sprague dawley. *Veterina Medika*. Vol. 1 No. 3, Nopember 2008
- Lisdawati Vivi, S Wiryowidagdo, L B S Kardono. Bioassay invitro antikanker terhadap sel Leukemia L1210 dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Jurnal bahan alam Indonesia*. 2006;5(1):309-303
- Lisdawati Vivi. 2009. Kajian Terhadap Prospek Pengembangan Bahan Bioaktif Buah Mahkota Dewa (*Phaleria Macorcarpa*) Sebagai Kandidat New Chemical Entity (NCE) Untuk Pengobatan Kanker (Sitostatika). *Buletin Penelitian Kesehatan*. Vol.37 No.1 (24-34)
- Maskyuroh Anik. 2005. Identifikasi Senyawa Dalam Ekstrak Biji Buah Mahkota Dewa. UNNES. Semarang.
- Rasjidi Imam, 2009. Deteksi Dini dan Pencegahan Kanker Pada Wanita. Sagung Seto. Jakarta
- Tjindarbumi Didid, Mangunkusumo Rukmini. 2002. Cancer in Indonesia, present and Future. *Japan Journal Clinic Oncology*. 32 (Supplement 10 817-821).
- Winarto,W.P, 2003, *Mahkota Dewa Budi Daya dan Pemanfaatan untuk obat*, Penebar Semangat, Jakarta.