



9 772686 250000

e-ISSN : 2686-2506



Uji Potensi Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Bambu-Bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) Dengan Metode Stabilisasi Membran Sel Darah Merah Secara *In Vitro*

F. I. Armadany^{1,*}, Wahyuni¹, M.Ardianti¹, A.N. T.A Mallarangeng^{1,2}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo, Kendari-Sulawesi Tenggara

²Fakultas SAINTEK, Jurusan Farmasi, Instiituit Teknologi dan Kesehatan Avicenna, Kendari-Sulawesi Tenggara

*Email korespondensi : feryia74@gmail.com

(Submit 15/03/2019, Revisi 05/09/2019, Diterima 20/12/2019)

Abstrak

Inflamasi merupakan rangkaian perubahan kompleks dalam jaringan akibat cedera yang disebabkan oleh bakteri, trauma, zat kimia, panas dan nyeri. Tumbuhan bambu-bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) adalah salah satu jenis tumbuhan perennial yang mengandung senyawa bioaktif dengan beberapa potensi aktivitas farmakologi, diantaranya sebagai antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dan uji aktivitas antiinflamasi dari daun bambu-bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) dengan menggunakan metode stabilisasi membran sel darah merah secara *in vitro*. Kandungan metabolit sekunder diidentifikasi menggunakan metode skrining fitokimia secara kualitatif berdasarkan reaksi pengujian warna. Pengujian potensi aktivitas antiinflamasi dilakukan dengan metode stabilisasi membran sel darah merah secara *In Vitro* yaitu melalui kemampuan daya hambat ekstrak etanol daun bambu-bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) terhadap lisis sel darah merah akibat induksi larutan hipotonis yang kemudian dibandingkan dengan kontrol positif yaitu natrium diklofenak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Polygonum pulchrum* Blume positif mengandung flavonoid, tanin, dan saponin. Nilai persentase stabilitas sel darah merah yang dimiliki oleh ekstrak etanol daun *Polygonum pulchrum* dengan konsentrasi 50, 100, 200, 400, 800, dan 1600 ppm berturut-turut adalah 58,13%; 67,3%; 75,72%; 83,28%; 87,05%; dan 92,99%. Adapun stabilitas persentase yang dimiliki oleh kontrol positif dengan konsentrasi 50, 100, 200, 400, 800, dan 1600 ppm adalah 58,99%; 66,38%; 73,24%; 80,58%; 82,95% dan 86,73%. Ekstrak etanol daun bambu-bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) pada semua variasi konsentrasi memiliki potensi aktivitas dalam menstabilkan membran sel darah merah.

Kata kunci: Antiinflamasi, membran sel darah merah, *Polygonum pulchrum* Blume

Outline

- Pendahuluan
- Metode
- Hasil dan Pembahasan
- Kesimpulan
- Ucapan Terima Kasih
- Daftar Pustaka

Pendahuluan

Jumlah tanaman obat di Indonesia merupakan 90% dari jumlah tanaman obat yang ada di kawasan Asia¹. Dewasa ini masyarakat banyak yang lebih memilih pengobatan dengan menggunakan tanaman obat dibandingkan dengan obat-obat kimia. Namun penggunaan tanaman obat tersebut harus diikuti dengan pengetahuan tentang khasiat tanaman obat tersebut di dalam tubuh, agar tanaman obat yang dikonsumsi memiliki pengaruh yang signifikan terhadap kesembuhan. Salah satu contoh khasiat tanaman obat adalah sebagai antiinflamasi². *Polygonum pulchrum* Blume merupakan tumbuhan yang terkenal menghasilkan berbagai metabolit sekunder termasuk flavonoid, triterpenoid, antrakuinon, kumarin, fenilpropanoid, lignan, sesquiterpenoid, stilben dan tanin³.

Beberapa penelitian mengenai kandungan kimia dari tanaman *Polygonum pulchrum* Blume telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas farmakologi dari tanaman tersebut. Penelitian oleh Vlietinck dkk⁴ menunjukkan bahwa ekstrak tanaman *Polygonum pulchrum* Blume memiliki aktivitas sebagai antivirus, antibakteri dan antifungi. Penelitian selanjutnya yang dilakukan oleh Johnson⁵ menunjukkan bahwa tanaman *Polygonum pulchrum* Blume memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Sahidin dkk⁶ menunjukkan bahwa ekstrak batang *Polygonum pulchrum* Blume mengandung salah satu senyawa golongan triterpen steroid yang berperan aktif sebagai antioksidan. Penelitian yang dilakukan oleh Poko⁷ pada ekstrak etanol tumbuhan *Polygonum pulchrum* Blume menunjukkan dosis yang optimal dan efektif sebagai antiperlipidemia. Penelitian berikutnya dilakukan oleh Sadino⁸ menunjukkan ekstrak daun *Polygonum* memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Penelitian yang telah dilakukan di atas, merupakan penelitian yang memaparkan potensi efek farmakologi dari tanaman *Polygonum pulchrum* Blume. Namun dari serangkaian penelitian tersebut, belum dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi dari *Polygonum pulchrum* Blume sebagai antiinflamasi.

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk pengujian antiinflamasi yaitu menggunakan metode stabilisasi sel darah merah (sel darah merah) manusia secara *in-vitro*. Metode ini digunakan karena sel darah merah mirip dengan membran lisosom yang dapat mempengaruhi proses inflamasi, sehingga jika kestabilan sel darah merah terjaga maka stabilisasi membran lisosom juga akan terjaga. Hal ini ditunjukkan melalui stabilisasinya terhadap sel darah merah yang di induksi dengan larutan hipotonik sehingga tidak terjadi lisis pada sel dan mencegah lepasnya hemoglobin (Hb)⁹. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun *Polygonum pulchrum* Blume dengan metode stabilisasi sel darah merah secara *in-vitro*.

Metode

A. Bahan

Daun tumbuhan bambu-bambu (*Polygonum pulchrum* Blume), NaCl, dinatrium hidrogen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), natrium dihidrogen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Natrium diklofenak, HCl, FeCl_3 (1%), pereaksi Lieberman-Bourchard, pereaksi Dragendorf, etanol 96%, serbuk magnesium, asam sulfat, reagen sianmet hemoglobin, pereaksi eosin, aquades, spoit, aluminium foil, kertas saring.

B. Metode

1. Pembuatan Ekstrak Tanaman

Sampel daun tumbuhan *Polygonum pulchrum* Blume diperoleh dan dikumpulkan di Kelurahan Kambu, Kota Kendari Provinsi Sulawesi Tenggara. Sampel disortasi basah dan kering kemudian dikering anginkan lalu dihaluskan hingga diperoleh serbuk simplisia. Selanjutnya serbuk simplisia diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

2. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan metode reaksi warna untuk menguji adanya alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan terpenoid.

3. Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia dilakukan dengan melihat parameter spesifik meliputi pemeriksaan organoleptik, penentuan kadar sari larut air dan sari larut etanol, dan parameter non spesifik meliputi penentuan kadar air dan kadar abu.

4. Uji Aktivitas Antiinflamasi Metode Stabilisasi Membran Sel darah merah

i. Pembuatan Larutan yang dibutuhkan

a. Pembuatan dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M)

121,5 mL larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,15 M) dicampurkan dengan 28,5 mL larutan $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,15 M) dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 115°C selama 30 menit.

b. Pembuatan Hiposalin

Larutan hiposalin dibuat kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 115°C selama 30 menit.

c. Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak dan Na diklofenak

Dibuat larutan induk ekstrak dan kontrol (Na diklofenak) dalam larutan isosalin (2000 ppm). Kemudian masing-masing larutan diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi (50, 100, 200, 400, 800, 1600 ppm).

ii. Pembuatan Suspensi Sel darah merah

Darah yang telah diperoleh dari *volunteer* (pendonor) dimasukkan ke dalam tabung sentrifus berisi larutan alsever steril sebanyak 10 mL. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan. Endapan sel-sel darah dicuci dengan larutan isosalin dan disentrifugasi kembali. Proses dilakukan beberapa kali hingga supernatan jernih. Kemudian dibuat suspensi sel darah merah 10% dengan mencampurkan 2 mL darah merah dengan 18 mL larutan isosalin.

iii. Pengujian Aktivitas Ekstrak Terhadap Stabilisasi Membran Sel darah merah

a. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Larutan blanko terdiri dari 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 2 mL hiposalin, 1 mL larutan isosalin dan 0,5 mL suspensi sel darah merah.

b. Pembuatan Larutan uji

Larutan uji terdiri dari 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 2 mL hiposalin, 0,5 mL suspensi sel darah merah dan 1 mL larutan sampel.

c. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Larutan kontrol positif terdiri dari 1 mL dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 2 mL hiposalin, 0,5 mL suspensi sel darah merah dan 1 mL larutan Na diklofenak (Shailesh, 2011).

d. Pengukuran Stabilitas Sel darah merah

Setiap larutan diinkubasi pada 56°C selama 30 menit dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Cairan supernatan yang didapat diambil dan kandungan hemoglobinya diperhitungkan dengan menggunakan photometer 5010 pada panjang gelombang 546 nm.

Persen stabilitas sel darah merah dapat dihitung dengan rumus, sebagai berikut (Chippada, dkk : 2011):

$$\% \text{ Hemolisis} = \frac{\text{Kadar hemoglobin larutan uji}}{\text{Kadar hemoglobin kontrol negatif}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Stabilitas} = 100 - \frac{\text{Kadar hemoglobin larutan uji}}{\text{Kadar hemoglobin kontrol negatif}} \times 100 \quad (2)$$

Hasil dan Pembahasan

A. Hasil

1. Skrining Fitokimia

Senyawa kimia yang dianalisis pada daun *Polygonum pulchrum* Blume adalah senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan terpenoid. Hasil skrining fitokimia daun *Polygonum pulchrum* Blume disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun *Polygonum pulchrum* Blume

Uji Fitokimia	Pereaksi	Rujukan	Hasil	Kesimpulan
Alkaloid	Dragendorf	Terbentuk endapan coklat atau merah hingga jingga	Tidak terbentuk endapan	Hasil (-)
Flavonoid	HCl + Mg	Terbentuk warna merah atau merah jingga	Terbentuk warna merah	Hasil (+)
Tannin	FeCl ₃	Terbentuk warna hijau ungu atau kehitaman	Terbentuk warna hijau kehitaman	Hasil (+)
Saponin	Air	Terbentuk busa setinggi 1-10 cm dan stabil tidak kurang dari 10 menit	Terbentuk busa	Hasil (+)
Terpenoid	Lieberman Burchard	Terbentuk warna coklat	Tidak terbentuk warna coklat	Hasil (-)

2. Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia dilakukan untuk melihat parameter spesifik (pemeriksaan organoleptik, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol) dan parameter non spesifik (kadar air dan kadar abu). Hasil karakterisasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil karakterisasi simplisia *Polygonum pulchrum* Blume

Jenis karakterisasi	Hasil
Organoleptis	
Bentuk	Lanset
Warna	Hijau
Bau	Khas
Kadar air	9,03%
Kadar abu	4,8%
Kadar sari larut etanol	22,06%
Kadar sari larut air	10,22%

3. Stabilisasi Sel darah merah

Hasil persentase stabilitas ekstrak etanol daun *Polygonum* dan natrium diklofenak sebagai pembanding menunjukkan semakin meningkatnya konsentrasi ekstrak maka meningkat pula potensi ekstrak dalam menstabilisasi sel darah merah, artinya potensi antiinflamasinya juga semakin meningkat. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai % Stabilitas Ekstrak Daun *Polygonum pulchrum* Blume dan Natrium Diklofenak

Konsentrasi	% Stabilitas Ekstrak Daun <i>Polygonum pulchrum</i> Blume	% Stabilitas Natrium Diklofenak
50 ppm	58,13 %	58,99 %
100 ppm	67,3 %	66,38 %
200 ppm	75,72 %	73,24 %
400 ppm	83,28 %	80,58 %
800 ppm	87,05 %	82,95 %
1600 ppm	92,99 %	87,05 %

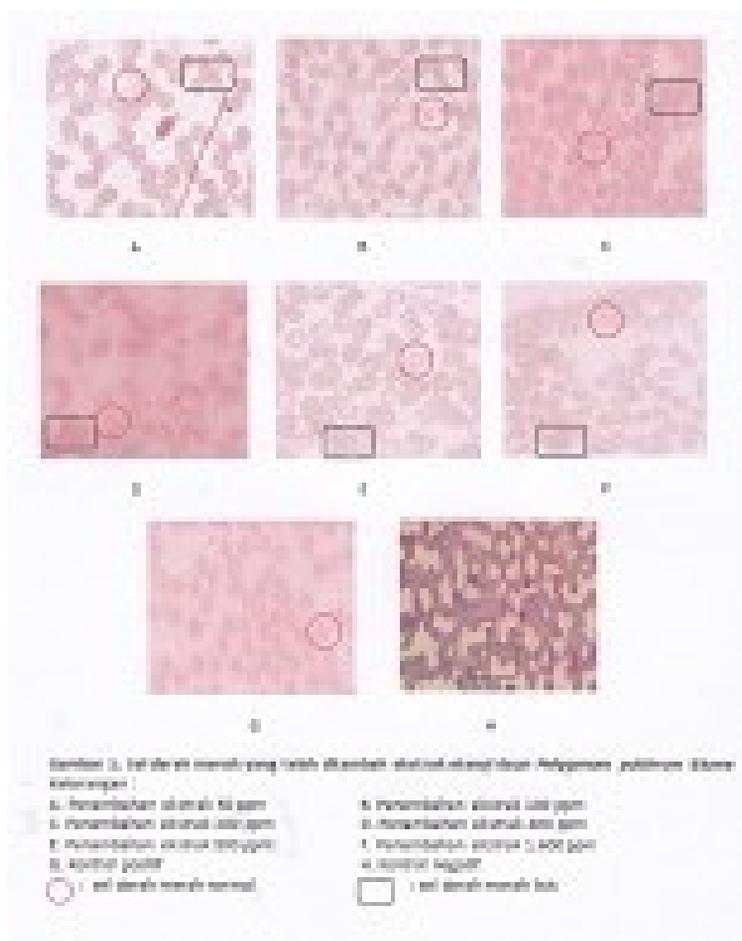
B. Pembahasan

Skrining fitokimia bertujuan untuk mendapatkan informasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalam daun *Polygonum pulchrum* Blume. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun *Polygonum pulchrum* Blume mengandung flavonoid, tannin dan saponin. Ketiga senyawa ini diduga berperan dalam menstabilkan sel darah merah. Flavonoid memiliki kemampuan memblok siklooksigenase, asam arakhidonat sehingga sintesis prostaglandin terhambat. Saponin dan tanin memiliki komponen untuk mengikat kation, sehingga menstabilkan membran sel darah merah dan makromolekul lainnya⁹.

Senyawa yang memiliki kemampuan untuk menstabilkan membran dikenal dapat mengganggu proses awal dari fase inflamasi yaitu pelepasan enzim fosfolipase A2. Pelepasan fosfolipase A2 dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan memicu terbentuknya radikal bebas. Fosfolipase A2 berfungsi mengubah fosfolipid dalam membran sel menjadi asam arakidonat, yang sangat efektif dan cepat dimetabolisme oleh enzim siklooksigenase menjadi prostaglandin. Prostaglandin merupakan mediator yang dapat menyebabkan terjadinya inflamasi.

Hasil penelitian Sadino⁸ sebelumnya telah menunjukkan bahwa daun *Polygonum pulchrum* Blume memiliki aktivitas antioksidan. Aktivitas antiinflamasi erat hubungannya dengan aktivitas antioksidan. Antioksidan ini dapat mencegah terjadinya stress oksidatif yang mempengaruhi kestabilan sel darah merah¹⁰. Sel darah merah sangat rentan terhadap radikal bebas (*reactive oxygen species/ROS*), oleh karena itu diperlukan senyawa antioksidan dan antiinflamasi yang dapat melindungi sel. Senyawa antioksidan akan menghambat atau memperlambat oksidasi melalui penangkapan radikal bebas, sedangkan senyawa antiinflamasi akan menstabilkan membran sel. Stress oksidatif terjadi karena kadar radikal bebas (*reactive oxygen species/ROS*) yang terlalu tinggi tidak mampu dinetralkan oleh antioksidan sehingga akan terjadi keadaan yang tidak seimbang antara radikal bebas (*reactive oxygen species/ROS*) dan antioksidan. Kelebihan dari radikal bebas (*reactive oxygen species/ROS*) dapat bereaksi dengan lipid, protein dan asam nukleat sehingga memicu kerusakan membran yang ditandai dengan hemolisis¹¹.

Sel darah merah merupakan salah satu komponen darah yang jumlahnya paling banyak dalam susunan komponen darah manusia. Darah yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah yang diperoleh dari sukarelawan sehat yang tidak mengkonsumsi obat AINS selama dua minggu yang diambil secara langsung oleh tenaga medis di Rumah Sakit Palang Merah Indonesia Kendari. Sel darah merah yang normal memiliki bentuk bikonkaf, tidak memiliki inti dan mengandung hemoglobin yang merupakan representasi warna merah dalam darah. Bentuk dari sel darah merah ini dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop (Gambar 1). Sel darah merah yang normal juga dapat dilihat melalui stabilitas membrannya. Bila sel darah merah terpapar zat berbahaya seperti larutan hipotonik atau berada di dalam media yang dipanaskan maka akan terjadi hemolisis. Pada keadaan hemolisis, maka membran sel dalam keadaan luka sehingga sel lebih rentan terhadap radikal bebas yang dapat mengakibatkan peroksidasi lipid dan akan mengakibatkan kerusakan sel yang lebih parah¹¹.



Gambar 1. Sel darah merah yang telah ditambah ekstrak etanol daun *Polygonum pulchrum* Blume

Stabilisasi dari sel darah merah digunakan sebagai metode untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi secara invitro. Hal ini dikarenakan sel darah merah mirip dengan membran lisosom yang dapat mempengaruhi proses inflamasi sehingga stabilitas lisosom penting dalam membatasi respon inflamasi, yaitu dengan cara mencegah pelepasan enzim dari dalam lisosom selama proses inflamasi berlangsung. Dengan demikian, stabilisasi sel darah merah yang diinduksi dengan larutan hipotonik dapat digunakan sebagai ukuran untuk mengindikasikan stabilisasi dari membran lisosom¹².

Hasil analisis larutan uji yang memiliki aktivitas antiinflamasi dapat dilihat dari besar kecilnya kadar hemoglobin yang terdapat pada larutan uji. Kadar hemoglobin yang kecil menandakan lisis yang terjadi juga sedikit dan sebaliknya jika kadar hemoglobinnya besar maka lisis yang terjadi juga banyak. Aktivitas antiinflamasi dari ekstrak daun *Polygonum pulchrum* Blume tidak hanya dilihat dari kadar hemoglobinnya tetapi dapat pula dilihat dari persen stabilitasnya.

Nilai persen stabilisasinya meningkat seiring bertambahnya konsentrasi disebabkan karena kandungan senyawa penstabil membran sel darah merah dalam setiap konsentrasi semakin meningkat. Data aktivitas antiinflamasi yang telah diperoleh dari masing-masing konsentrasi ekstrak dan natrium diklofenak dilakukan uji statistik menggunakan SPSS (*Statistical Package For Social Science*) ANOVA satu arah dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT/LSD) dengan metode Tukey kemudian dilakukan pengujian menggunakan homogeneous subsets untuk mengetahui sampel yang tidak berbeda secara signifikan atau identik, Hasil analisis menggunakan *homogeneous subsets* menunjukkan bahwa ekstrak dengan konsentrasi 400 ppm, 800 ppm dan 1600 ppm identik dengan natrium diklofenak konsentrasi 1600 ppm. Oleh karena itu ekstrak daun *Polygonum pulchrum* Blume dapat berpotensi sebagai antiinflamasi.

Kesimpulan

- a. Kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam daun tumbuhan bambu-bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) adalah flavonoid, tanin dan saponin.
- b. Daun tumbuhan bambu-bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) memiliki kemampuan antiinflamasi yang diukur menggunakan metode stabilisasi sel darah merah. Persentase stabilitas ekstrak etanol daun tumbuhan bambu-bambu (*Polygonum pulchrum* Blume) yaitu pada 50 ppm (58,13%), 100 ppm (67,3%), 200 ppm (75,72%), 400 ppm (83,28%), 800 ppm (87,05%) dan 1600 ppm (92,99%) menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin tinggi pula aktivitas antiinflamasinya.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo dan RS PMI Propinsi Sulawesi Tenggara atas fasilitas yang telah diberikan.

Daftar Pustaka

1. Narande, J. M., Anne W. Dan Adithya Y., Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Suji (*Dracaena Angustifolia Roxb*) Terhadap Edema Kaki Tikus Putih Jantan Galur Wistar, *Jurnal Ilmiah Farmasi* 2013, 2(3); 2302 – 2493.
2. Riduan R. J., Pengaruh Pemberian Ekstrak Jahe Merah terhadap Gambaran Histopatologi Pankreas yang Diinduksi Alokstan, *Majority*, 2015, 4(8).
3. Lopez, S. N., Sierra M. G., Gattuso S. J., Furlan R. L. dan Zacchino S. A., An Unusual Homoisoflavanone and Structurally-Related Dihydrochalcone from *Polygonum ferrugineum* (Polygonaceae), *Phytochemistry* 2006, 67(6); 2152–2158.

4. Vlientinck A. J, Van L. H, Totte. J, Lasure. A, Vanden B. D, Rwangabo P. C dan Mvukiyumwami. J., Screening of Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral Properties, *Journal of Ethnopharmacology*, 1995, 46 ; 31-47.
5. Johnson, T., *CRC Ethnobotany Desk Reference*, CRC Press. California. 1998.
6. Sahidin, Nohong, Asrul S., Marianti A., Asep S., Harto W., Syarulnataqain B., Radical Scavenging Activity Of Triterpene Steroids From Stem Of *Polygonum pulchrum* Bl, *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 2014, 6; 0975-1491.
7. Poko F.,R., *Skrining Fitokimia dan Uji Efek Antihiperlipidemia Ekstrak Etanol Batang Tanaman Bambu-bambu (Polygonum puchrum Blume) pada Mencit Jantan Galur BALB/C*, Skripsi 2015, Universitas Halu Oleo, Kendari.
8. Sadino, A., Uji Aktivitas Antimikroba, Antioksidan Dan Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Akar, Batang, Daun Dan Bunga Tumbuhan Bambu-Bambu (*Polygonum pulchrum Blume*), Skripsi 2016, Universitas Halu Oleo, Kendari.
9. Arifah R. N, Nora I, M. Agus W., 2017, Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Kasar Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* (Griff.) Buret) Secara In-Vitro Dengan Metode Stabilisasi Membran HRBC (*Human Red Blood Cell*), *JKK*, 2017, 6(1); 2303-1077.
10. Kumar, V., Bhat Z. A., Dinesh. K., Puja. B., Sheela. S., In Vitro Anti-Inflammatory Activity of Leaf Extracts of *Basella Alba* Linn. Var. Alba, *International Journal of Drug Development and Research*, 2011, 3(2); 0975-9344.
11. Murningsih, T., dan Ahmad F., Evaluasi Aktivitas Anti-Inflamasi dan Antioksidan Secara *In-Vitro*, Kandungan Fenolat dan Flavonoid Total Pada *Terminalis* spp., *Berita Biologi*, 2016, 15(2); 159-166
12. Wiranto E., Muhamad A. W., Puji A., Aktivitas Antiinflamasi Secara In-Vitro Ekstrak Teripang Butoh Keling (*Holothuria leucospilota* Brandt) dari Pulau Lemukutan, *JKK*, 2016, 5(1).