Penapisan Fitokimia dan Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Beberapa Tanaman Obat Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Musadar Mappasomba¹, Bayu Wirasmanto², Muhammad Hajrul Malaka², Wahyuni², Sahidin^{2*}

¹) Fakultas Pertanian Universitas Halu Oleo, Kampus Hijau Bumi Tridharma Anduonohu, Jl. H. E. A. Mokodompit Kendari 93232

²) Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo, Kampus Hijau Bumi Tridharma Anduonohu, Jl. H. E. A. Mokodompit Kendari 93232

E-mail: sahidin02@uho.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol beberapa tanaman obat yang sering digunakan masyarakat Sulawesi Tenggara diantaranya miana (*C. scutellaroides* L.), ketepeng cina (*C. alata* L.), eceng gondok (*E. crassipes*), kayu jawa (*L. coromandelica* H.), dan nenas (*A. comocorus* L.) serta mengetahui tingkat toksisitasnya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Sampel terdiri dari lima tanaman obat yang telah dipisahkan perbagiannya berupa akar, batang, daun, bunga dan buah. Ekstraksi menggunakan teknik maserasi, skrining fitokimia menggunakan teknik Kromatografi Lapis Tipis, serta pengujian toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* L. Data kematian larva dianalisis dengan analisis probit untuk mengetahui nilai LC_{50} pada masing-masing sampel, dimana ekstrak dikatakan toksik bila nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Hasil skrining fitokimia menunjukkan adanya kandungan flavonoid, tanin dan saponin pada setiap tanaman, kandungan alkaloid tidak terdapat pada tanaman *E. crassipes*, dan senyawa triterpenoid hanya terdapat pada daun tanaman *C. alata* L. Hasil pengujian toksisitas menunjukkan bahwa dari delapan belas sampel yang telah diuji, dua belas diantaranya bersifat toksik. Sampel yang memiliki nilai LC_{50} terkecil ($120,573 \mu\text{g/mL}$) adalah kulit batang *L. coromandelica* sedangkan nilai LC_{50} terbesar ($1510,415 \mu\text{g/mL}$) ditunjukkan oleh daun *C. scutellaroides* L.

Kata kunci: ekstrak, toksisitas, skrining, *Artemia*, BSLT

1. Pendahuluan

Pertambahan jumlah penduduk dunia yang sangat pesat terutama di negara-negara berkembang seperti Indonesia dapat menimbulkan masalah kesehatan. Oleh karena itu kebutuhan akan suatu obat yang dapat mencegah atau mengobati dari penyakit tertentu mutlak diperlukan keberadaannya [1]. Obat tradisional merupakan pilihan pengobatan yang kini makin diminati, terlebih lagi dengan kesadaran untuk kembali ke alam. Penggunaan tanaman obat atau obat tradisional relatif lebih aman dibandingkan obat sintesis [2]. Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan, hewan, mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara tradisional telah digunakan untuk pengobatan [3].

Beberapa tanaman obat yang sering digunakan masyarakat untuk menyembuhkan penyakit diantaranya miana (*Coleus scutellaroides* L.), ketepeng cina (*Cassia alata* L.), eceng gondok (*Eichhornia crassipes*), kayu jawa (*Lannea coromandelica* H.), dan nenas (*Ananas comocorus* L.). Tanaman-tanaman tersebut digunakan langsung maupun diolah secara tradisional untuk mengobati berbagai penyakit diantaranya penyakit kulit, mempercepat penyembuhan luka, obat cacing, batuk, peluruh haid, antiinflamasi maupun penambah nafsu makan [4]. Pemanfaatan tanaman obat di masyarakat masih

berdasarkan pengalaman empiris, sehingga perlu didukung oleh informasi ilmiah mengenai kandungan senyawa kimia, khasiat, dan efek samping. Bahan tanaman yang bersifat toksik disebabkan oleh adanya kandungan senyawa metabolit sekunder, sehingga perlu dilakukan identifikasi metabolit sekunder yang terdapat dalam tanaman obat tersebut [5].

Toksisitas dapat diartikan sebagai suatu keadaan yang menandakan adanya efek toksik atau racun yang terdapat pada suatu bahan sebagai sediaan dosis tunggal atau campuran [6]. Salah satu metode yang digunakan dalam menentukan efek toksik dari suatu tanaman adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini telah dibuktikan memiliki korelasi dengan adanya daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker [7, 8]. Metode ini dilakukan dengan menentukan besarnya LC_{50} selama 24 jam. Suatu ekstrak tanaman dikatakan toksik jika nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ [9].

Untuk keamanan dan pemanfaatan dari tanaman-tanaman obat tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang skrining fitokimia dan uji toksisitas akut ekstrak metanol beberapa tanaman obat terhadap larva udang *Artemia salina* Leach menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Penelitian ini dipilih karena masih kurangnya informasi ilmiah mengenai kandungan kimia serta potensi toksisitas tanaman-tanaman obat tersebut.

2. Metode

2.1 Umum

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental eksplorasi dengan pendekatan post test-only control group design. Sampel tanaman diperoleh dari area Kecamatan Poasia, Kota Kendari. Benih udang *Artemia salina* Leach diperoleh di Laboratorium Farmasi Universitas Halu Oleo, dan air laut dengan salinitas terstandar diperoleh di Balai Benih Udang Dinas Kelautan dan Perikanan Provinsi Sulawesi Tenggara, Purirano, Kendari.

2.2 Penyiapan Sampel dan Ekstraksi

Total keseluruhan sampel mencapai delapan belas bagian tanaman. Preparasi dilakukan dengan memotong-motong sampel yang sebelumnya telah dibersihkan, selanjutnya dikering-anginkan dengan sinar matahari. Simplis kering selanjutnya diserbukkan sampai menjadi partikel kecil. Ekstraksi maserasi serbuk tanaman dilakukan dalam wadah tertutup selama 3 x 24 jam dengan sesekali pengadukan menggunakan pelarut metanol dengan penggantian pelarut setiap 1x24 jam. Filtrat hasil maserasi dikumpulkan dan dipekatkan dengan evaporator pada suhu 55°C hingga diperoleh ekstrak kental.

2.3 Penapisan Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan dengan menggunakan plat KLT G₆₀ F₂₅₄. Masing-masing plat dengan ukuran 9 x 5 cm². Ekstrak dari masing-masing tanaman ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Fase gerak dan reagen penguji masing-masing golongan senyawa adalah sebagai berikut:

- Golongan senyawa alkaloid: fase gerak kloroform-metanol (9:1) dan pereaksi Dragendorff untuk mendeteksi yang menunjukkan bercak coklat jingga
- Golongan senyawa flavonoid menggunakan fase gerak kloroform: metanol (8:2) dan diberi uap amonia yang akan menghasilkan warna biru kehijauan
- Golongan senyawa tannin menggunakan fase gerak metanol-aseton (5:5), kemudian disemprot dengan FeCl₃ 1% menghasilkan warna biru kehitaman
- Golongan senyawa saponin menggunakan fase gerak kloroform-metanol-air (2:6:1) ketika ditambah H₂SO₄ menimbulkan warna ungu gelap.
- Golongan senyawa triterpenoid menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat (2:8) disemprot dengan pereaksi Lieberman-burchard menghasilkan warna merah ungu

2.4 Uji Toksisitas Akut

Pembuatan Larutan Stok

Larutan stok dari masing-masing bahan uji dengan dibuat dengan melarutkan 0,5 g sampel dalam pelarut metanol sampai tepat 50 mL sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 10.000 µg/mL. Seri konsentrasi

sampel uji dibuat dengan pengambilan volume tertentu dari larutan stok menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam vial. Pembuatan kontrol uji dilakukan dengan memasukkan pelarut tanpa sampel ke dalam vial. Kontrol tersebut diperlukan untuk mengevaluasi kemungkinan timbulnya efek karena pelarut yang belum menguap sempurna dan pengaruh lain selain pelarut terhadap uji yang dilakukan. Vial yang telah diisi sampel dan kontrol diangin-anginkan hingga kering dan tidak berbau pelarut lagi.

Penetasan Larva

Penetasan telur *A. salina* L. dilakukan dalam wadah penetas telur atau akuarium mini dengan dua bagian ruang bersekat, satu bagian ruang gelap dan yang satu terang. Sekat dibuat berlubang dengan diameter ±2 mm. Air laut dimasukkan ke dalam wadah, serta diaerasi menggunakan aerator. Sejumlah telur *A. salina* L. dimasukkan ke dalam satu ruang, kemudian ruang tersebut ditutup. Sisi yang lain dibiarkan terbuka dan diberi lampu untuk menarik *A. salina* L. yang telah menetas melalui lubang sekat. Telur akan menetas 18-24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas [11,12,13].

Uji Toksisitas

Pengujian sampel dilakukan dengan cara memasukkan masing-masing sampel ke dalam vial yang kemudian diuapkan dengan diangin-anginkan hingga pelarutnya hilang. Selanjutnya vial diisi air laut 2 mL, kemudian digoyang-goyangkan kurang lebih selama 1 menit untuk dihomogenkan. Ekstrak yang sukar larut air laut terlebih dahulu ditambahkan DMSO dengan batas penggunaan 100 µl per 10 mL. Sepuluh ekor larva *A. salina* berumur 48 jam yang sehat (bergerak aktif) dipilih secara acak, dimasukkan ke dalam vial yang berisi sampel yang bebas pelarut menggunakan pipet tetes kemudian ditambahkan air laut sampai 10 mL. Satu tetes suspensi tepung jagung (3 mg/10 mL air laut) ditambahkan ke dalamnya sebagai makanan *A. salina* L. Vial diletakkan di bawah lampu penerangan selama 24 jam dan dihitung jumlah larva *A. salina* L. yang mati (tidak bergerak lagi) [12,13]. Dilakukan tiga kali replikasi untuk tiap-tiap seri konsentrasi sampel.

Pengolahan dan Analisis Data

Jumlah persen kematian larva uji setelah 24 jam perlakuan dengan menggunakan rumus berikut (Meyer dkk., 1982).

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Jika terjadi kematian pada kontrol uji dapat dikoreksi dengan rumus Abbot, yaitu:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina mati (uji-kontrol)}}{\text{jumlah larva uji-kontrol yang mati}} \times 100\%$$

Analisis probit antara konsentrasi uji dan jumlah kematian larva dianalisis dengan menggunakan Minitab®

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia sampel

Sampel		Profil Fitokimia				
		Alkaloid	Flavonoid	Terpenoid	Saponin	Tanin
E	E ₁	-	-	-	1	-
	E ₂	-	5	-	-	1
	E ₃	-	1	-	1	1
J	J ₁	1	-	-	2	2
	J ₂	1	4	-	2	2
	J ₃	-	5	-	1	2
K	K ₁	1	-	-	1	1
	K ₂	1	1	-	1	1
	K ₃	1	4	1	1	1
	K ₄	-	1	-	1	-
	K ₅	1	1	-	1	1
M	M ₁	1	1	-	2	2
	M ₂	1	1	-	2	1
	M ₃	1	3	-	1	1
	M ₄	1	1	-	1	1
N	N ₁	-	-	-	2	1
	N ₂	1	2	-	1	2
	N ₃	-	2	-	-	1

Keterangan:

E₁ : Akar *E. crassipes*E₂ : Daun *E. crassipes*E₃ : Bunga *E. crassipes*J₁ : Akar *L. coromandelica* H.J₂ : Kulit batang *L. coromandelica* H.J₃ : Daun *L. coromandelica* H.K₁ : Akar *C. alata* L.K₂ : Kulit batang *C. alata* L.K₃ : Daun *C. alata* L.K₄ : Bunga *C. alata* L.K₅ : Buah *C. alata* L.M₁ : Akar *C. scutellaroides* L.M₂ : Batang *C. scutellaroides* L.M₃ : Daun *C. scutellaroides* L.M₄ : Bunga *C. scutellaroides* L.N₁ : Akar *A. comocus* L.N₂ : Daun *A. comocus* L.N₃ : Kulit buah *A. comocus* L.

ver 17.1.2 sehingga menunjukkan nilai LC₅₀ dari masing-masing sampel [13]. Ekstrak dikatakan toksik apabila nilai LC₅₀ di bawah atau sama dengan 500 ppm untuk ekstrak atau fraksi [14].

3. Hasil dan Pembahasan

Penapisan fitokimia dilakukan untuk memberi gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Untuk mengetahui golongan senyawa yang ada dalam sampel maka ditambahkan pereaksi untuk menguji ada tidaknya senyawa tertentu dalam sampel. Penapisan fitokimia pada masing-masing ekstrak tanaman telah memperjelas penelitian-penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya tentang kandungan metabolit sekunder pada tanaman tersebut, sekaligus menambah informasi mengenai kandungan metabolit yang tersebar pada berbagai bagian tanaman.

Toksisitas merupakan suatu keadaan yang menandakan adanya efek toksik atau racun pada suatu bahan atau campuran bahan. Uji toksisitas akut merupakan pengujian dengan cara pemberian obat atau zat tertentu sebanyak satu kali dalam jangka waktu 24 jam. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah salah satu metode skrining untuk menentukan toksisitas suatu senyawa atau ekstrak secara akut dengan menggunakan hewan coba *Artemia salina*. Daya toksisitas suatu senyawa dapat diketahui dengan menghitung jumlah kematian larva *Artemia salina* dengan parameter *lethal concentration* 50

(LC₅₀). Suatu ekstrak dinyatakan bersifat toksik menurut metode BST ini jika memiliki LC₅₀ kurang dari 1000 µg/mL. Jika hasil uji BST menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan bersifat toksik maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa sitotoksik tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat alternatif antikanker, sebaliknya jika hasil uji BST tidak bersifat toksik maka dapat pula dikembangkan ke penelitian lanjutan menggunakan hewan coba yang lebih besar sebagai usaha pengembangan obat herbal terstandar dan fitofarmaka.

Senyawa bioaktif hampir selalu bersifat toksik pada dosis tinggi, oleh karena itu daya bunuh *in vitro* senyawa pada hewan coba, dapat dijadikan pengujian untuk ekstrak tanaman yang mempunyai bioaktivitas. *Artemia salina* merupakan salah satu hewan coba yang sangat sesuai untuk pengujian tersebut, hal ini karena pengujiannya cepat, tidak memerlukan teknik aseptik, murah (tidak membutuhkan serum hewan), jumlah organisme banyak sehingga memenuhi kebutuhan validasi statistik dan hanya membutuhkan sedikit sampel.

Fase yang digunakan dalam penelitian ini adalah fase *nauplius* karena pada saat itu *A. salina* Leach berada pada fase yang paling aktif membelah secara mitosis yang identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis. Hal ini menyebabkan uji BSLT ini sering digunakan sebagai penelitian pendahuluan dari aktivitas antikanker. Salah satu mekanisme kerja obat antikanker

juga bersifat sitotoksik yaitu dengan cara menghambat pertumbuhan sel yang akhirnya menyebabkan kematian pada sel sedangkan mekanisme aktivitas sitotoksik pada *A. salina* Leach belum diketahui secara pasti [13].

Tabel 2. Hasil Perhitungan Nilai LC_{50} masing-masing tanaman perbagiannya.

No	Nama Tanaman	Bagian Tanaman	LC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
1	<i>E. crasippes</i>	Akar	530,161
		Daun	388,670
		Bunga	345,199
2	<i>L. coromandelica</i>	Akar	122,194
		Kulit Batang	120,573
		Daun	521,217
3	<i>C. alata</i> L.	Akar	1062,960
		Kulit Batang	223,095
		Daun	1049,352
		Bunga	1079,233
		Buah	1116,823
4	<i>C. scutellaroides</i> L.	Akar	605,480
		Batang	1030,293
		Daun	1510,415
		Bunga	127,495
5	<i>A. comocus</i> L.	Akar	205,076
		Daun	221,469
		Kulit Buah	358,323

Sebanyak 18 sampel tanaman tersebut ternyata yang menunjukkan nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ jauh lebih banyak dibandingkan sampel yang memiliki nilai $LC_{50} > 1000$, artinya sampel yang bersifat toksik menurut metode BST jauh lebih banyak dibandingkan sampel yang tidak bersifat toksik, sampel tanaman yang bersifat toksik menurut metode BSLT berjumlah 12 sampel, sementara yang bersifat tidak toksik menurut metode BST hanya berjumlah 6 sampel. Sampel yang menunjukkan nilai LC_{50} terkecil pada tabel diatas adalah kulit batang *L. coromandelica* dengan nilai LC_{50} sebesar $120,573 \mu\text{g/mL}$, artinya kulit batang *L. coromandelica* memiliki potensi toksik paling tinggidibandingkan bagian tanaman yang lain, sedangkan sampel yang menunjukkan nilai LC_{50} terbesar adalah daun *C. scutellaroides* L. dengan nilai LC_{50} sebesar $1510,415 \mu\text{g/mL}$, artinya daun *C. scutellaroides* L. memiliki potensi tidak toksik paling tinggi dibandingkan sampel yang lain.

Ketoksikan suatu tanaman berkaitan dengan metabolit sekunder yang terkandung didalamnya, sebagian besar metabolit sekunder yang terdapat didalam satu tanaman sama, akan tetapi penyebarannya tidak selalu merata, sehingga dapat perbedaan aktifitas yang cukup nampak antara bagian tanaman tertentu dan bagian lainnya. Senyawa golongan flavonoid, alkaloid, triterpenoid, saponin dan tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu tanaman, metabolit ini digunakan tanaman sebagai bentuk pertahanan diri dari mahluk hidup lain yang mengancam dirinya. Beberapa golongan metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid

dan triterpenoid dapat menginduksi kematian sel dan karena kemampuan itu sehingga senyawa tersebut dapat digunakan sebagai agen antikanker. Senyawa golongan flavonoid dapat menginduksi fragmentasi DNA yang mengakibatkan DNA menjadi rusak, kerusakan DNA mengakibatkan ekspresi protein proapoptosis sehingga terjadilah proses apoptosis sel yang mengakibatkan kematian sel, senyawa flavonoid juga dapat menghambat reseptor tirosin kinase sehingga proses transduksi signal terhalang, akibatnya proses pertumbuhan sel dapat terhalang dan mengakibatkan kematian sel.

Beberapa golongan senyawa alkaloid juga dapat bersifat sitotoksik, yaitu berperan sebagai tubulin inhibitor. Alkaloid dapat berikatan dengan tubulin, yaitu protein yang menyusun mikrotubulus. Terkaitnya tubulin pada alkaloid mengakibatkan polimerasi protein menjadi mikrotubulus akan terhambat sehingga pembentukan *spindle* mitotik akan terhambat pula dan siklus sel akan terhenti pada metafase. Karena tidak dapat melakukan pembelahan sel, sel tersebut kemudian akan mengalami apoptosis. Senyawa golongan triterpenoid dapat memblokir siklus sel pada fase gap 2 (pada tahap interfase) dengan menstabilkan benang-benang *spindle* pada fase mitosis sehingga menyebabkan proses mitosis terhambat. Pada tahap selanjutnya akan terjadi penghambatan proliferasi sel dan pemacuan apoptosis. Terjadinya proses apoptosis dan penghambatan pertumbuhan sel dapat mematikan larva *Artemia* pada uji toksisitas menggunakan metode BST sehingga pengujian ini dapat digunakan sebagai salah satu cara pencarian obat-obat yang memiliki potensi sebagai antikanker. Disamping itu kandungan metabolit seperti saponin dan tanin juga dapat mematikan larva *Artemia*, senyawa golongan saponin dan tanin memiliki rasa yang pahit sehingga dapat mengganggu stimulasi rasa pada *Artemia*, hal ini dapat membuat larva *artemia* tidak mampu mengenali makanannya dan akhirnya mati karena kelaparan. Senyawa golongan saponin juga dapat mengikat oksigen yang terdapat didalam air sehingga kadar oksigen didalam air menurun dan larva *Artemia* dapat mati karena kekurangan oksigen.

Hampir semua tanaman yang memiliki kandungan bioaktif akan bersifat toksik pada dosis tinggi, sehingga dapat dikatakan bahwa tanaman-tanaman diatas banyak memiliki kandungan bioaktif dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensinya. Apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut harga LC_{50} dengan metode BST, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai kandidat obat antikanker. Namun, bila tidak bersifat toksik maka tanaman tersebut dapat diteliti kembali untuk mengetahui khasiatnya dengan menggunakan hewan coba yang lebih besar dari larva *Artemia salina* seperti mencit dan tikus secara in vivo untuk pengembangan obat herbal terstandar (OHT) maupun fitofarmaka.

4. Kesimpulan

Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa kandungan metabolit sekunder seperti flavonoid dan saponin cukup banyak terdistribusi di bagian tanaman. Dari

18 sampel, mayoritas sampel memiliki sifat toksik dengan rata-rata $LC_{50} < 1000$ ppm.

Daftar Pustaka

1. Ruslin dan Sahidin, I., 2008, Identifikasi dan Determinasi Tanaman Obat Tradisional Masyarakat Sulawesi Tenggara pada Arboretum Prof. Mahmud Hamundu Universitas Haluoleo, *Majalah Farmasi Indonesia*, **19(2)**: 101-107.
2. Nur RA, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST), *Laporan Akhir Penelitian Karya Tulis Ilmiah*, Universitas Diponegoro, 2009.
3. Dirjen POM. *Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional*, Edisi 1, Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, 2000.
4. Kemenkes RI, Riset Khusus Eksplorasi Pengetahuan Lokal Etnomedisin dan Tumbuhan Obat Di Indonesia Berbasis Komunitas, *Ristoja: Laporan Provinsi Sulawesi Tenggara*, 2012.
5. Sangi MS, Momuat LI, Kumaunang M, Uji Toksisitas Dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arenga pinnata*), *Jurnal Ilmiah Sains*, 2012, **12(2)**.
6. Hodgson E, *A Textbook of Modern Toxicology*, 4th Ed, North Carolina: John Wiley & Sons. Inc., Publication, 2010; 225 – 236.
7. Fitrah M, Tahar N, Husniar, Uji toksisitas fraksi daun pedada (*Sonneratia caseolaris* L.) terhadap larva udang (*Artemia salina* leach) dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), *Jurnal Para Pemikir*, 2018, **7(1)**:181-186
8. Carballo JL, Hernandez ZL, Perez P, Garcia, MD, Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products, *BMC Biotechnology*, 2002, **2**, 1472-6570.
9. Oratmangun SA, Fatimawali, Bodhi W, 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, *Pharmacon: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2014, **3(3)**
10. Harborne JB, *Metode Fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Bandung: Penerbit ITB, 1987.
11. McLaughlin JL, Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination, *Methods in Plants Biochemistry*, 1991, **6(1)**:1-30.
12. Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL, A blind Comparison of Simple Banch-top Bioassay and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Anti tumour Prescreen, *Phytochemical Analysis*, 1991, **6**:107-111.
13. Sadarun B, Malaka MH, Wahyuni W, I Sahidin, Toksisitas Akut Senyawa Metabolit Sekunder dari Spons Laut *Clathria* sp., *Pharmauho*, **3(1)**:6-9.
14. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nicholas DE, McLaughlin JL, *Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent*. *Departement of Medical Chemistry and Pharmacognosy*, School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Cell Culture Laboratory, Perdue Cancer Center, West Lavayette, 1982.

© 2019 by the authors; This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)