

TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL DAUN, DAGING BUAH DAN BIJI MENGKUDU (*Morinda citrifolia* Linn.) METODE BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Ahsanal Fikri ¹⁾, Slamet ²⁾, Eko Mugiyanto ³⁾

^{1, 2, 3} Program Studi S1 Farmasi, STIKES Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan
E-mail : fikri.ahsanal@gmail.com

Abstract

Noni (Morinda citrifolia Linn.) Is one of medicinal plants in Indonesia that has been used empirically. Utilization any substances have potential toxicity depend on the dose that the reason to it should be assay early. The purpose of this study was to determine the toxicity potential of ethanol extract of leaves, fruit flesh and noni seeds by Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The data were analyzed by probit method to obtain LC₅₀ (Lethal Concetration 50%) and assay with one way ANOVA statistic test. The value of LC₅₀ in ethanol extract of leaf, fruit flesh and noni seeds were 25,32 µg/ml, 35,56 µg/ml, 27,23 µg/ml respectively (p<0,05) according to statistical test one way ANOVA. BSLT test results showed that LC₅₀<1000 µg/ml which means that the three samples are toxic and potentially anti-cancer to be investigated further.

Keywords : *Noni (Morinda citrifolia Linn.), Larvae, Artemia salina Leach., Lethal Concetration 50% (LC₅₀).*

1. PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia telah lama memanfaatkan tanaman obat sebagai obat tradisional secara turun-temurun. Salah satu tanaman obat yang ada di Indonesia adalah tanaman mengkudu. Pemanfaatan mengkudu sebagai obat tradisional sebenarnya sudah sejak lama dikenal, baik di Indonesia maupun di luar negeri. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa mengkudu dapat digunakan sebagai obat tumor dan kanker (Hirazumi, dkk., 1999).

Daun mengkudu mengandung senyawa flavonoid, senyawa ini merupakan golongan senyawa fenol di alam yang terdapat pada tumbuhan yang mempunyai sifat sebagai antimikroba. Buah mengkudu mengandung zat antikanker yang dinamakan dengan *damnacanthal*, zat ini sangat efektif melawan sel-sel abnormal dibanding zat-zat antikanker yang terdapat pada tumbuhan lainnya. Penelitian ilmuwan Jerman menunjukkan bahwa *damnacanthal* yang terkandung pada daun mengkudu mampu menghambat perkembangan sel-sel kanker (Nirawati, 2016). Biji mengkudu mengandung senyawa alkaloid, saponin,

tanin dan glikosida jantung (Ariyanto, dkk, 2016).

Obat yang berasal dari bahan alam yang dianggap aman oleh masyarakat juga perlu diwaspadai. Hal ini dikarenakan setiap bahan atau zat memiliki potensi bersifat toksik tergantung dosisnya. Mengingat pemanfaatan mengkudu yang beragam tetapi masih berdasarkan pengalaman secara turun-temurun, maka masih perlu didukung oleh informasi ilmiah mengenai khasiat dan efek samping yang ditimbulkan. Untuk keamanan pemanfaatan mengkudu maka perlu dilakukan penelitian uji toksisitas ekstrak etanol daun, daging buah dan biji mengkudu terhadap larva *Artemia salina* Leach. menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Uji toksisitas ekstrak etanol mengkudu ini dipilih mengingat masih kurangnya informasi ilmiah mengenai potensi toksisitas tanaman mengkudu. Metode BSLT dipilih karena metode ini merupakan langkah pertama untuk uji toksisitas suatu ekstrak atau senyawa. Selain itu, metode BSLT ini sederhana, cepat, murah, dan dapat dipercaya. Penelitian Carballo dkk.

(Carballo, 2002) menunjukkan adanya hubungan yang konsisten antara toksisitas dan letalitas *Brine shrimp* pada ekstrak tanaman.

Larva udang *Artemia salina* Leach. atau pada tahap nauplius dipilih sebagai hewan uji pada metode ini karena identik dengan sel kanker pada manusia yaitu sel HeLa (Juhaeriah, 2013). Suatu ekstrak dinyatakan bersifat toksik menurut metode BSLT ini jika memiliki LC_{50} (*Lethal Concentration 50%*) kurang dari 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Meyer, dkk., 1982).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan potensi toksisitas pada ekstrak etanol daun, daging buah dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) berdasarkan nilai LC_{50} .

2. METODE PENELITIAN

Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup keilmuan penelitian ini meliputi bidang farmasi dan toksikologi.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah gelas ukur, beaker glass, tabung reaksi, pisau, neraca analitik (OHAUS), pipet, batang pengaduk kaca, lup, vial atau botol kaca, kain hitam, kain flanel, kertas saring, *vacum rotary evaporator* (HEIDOLPH), mikropipet, cawan porselen, penangas air, oven, pipa kecil, aerator, lampu, mikroskop, kaca pembesar, dan spektrofotometer UV-Vis (SHIMADZU).

Bahan-bahan yang digunakan adalah ekstrak etanol daun, daging buah dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.), etanol 96%, akuades, larva *Artemia salina* Leach. (SUPREME Plus), ragi sebagai pakan larva udang dan air laut buatan.

Prosedur Kerja

a. Pembuatan ekstrak

Timbang daun, daging buah dan biji mengkudu masing-masing 200 gram yang sudah kering dan menjadi serbuk. Ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam, lalu

disaring. Residu direndam kembali dalam etanol 96% sampai tersari atau terekstraksi sempurna. Saring kembali dan filtrat dikumpulkan. Pisahkan pelarut dengan menggunakan *vacum rotary evaporator*. Kentalkan dengan *waterbath*. Ekstrak disimpan dalam lemari pendingin suhu 0-3°C.

b. Uji pendahuluan

Total Fenol (Waterhouse, 1999)

- (i) Pembuatan larutan induk asam galat (1 mg/mL)

Ditimbang 50 mg asam galat tambahkan 1 mL etanol 96%. Kemudian tambahkan akuades sampai volume akhir 50 ml.

- (ii) Pembuatan larutan Na_2CO_3 10%

Ditimbang 10 gr Na_2CO_3 . Tambahkan akuades sampai 100 ml. Kemudian didiamkan selama 24 jam.

- (iii) Pembuatan kurva kalibrasi asam galat dengan reagen fenol *Folin-Ciocalteu*

Ditimbang 50 mg asam galat, tambahkan 1 ml etanol 96%. Tambahkan akuades sampai volume akhir 50 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Dari larutan induk asam galat konsentrasi 1 mg/mL dipipet 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml dan 3 ml, secara berturut turut. Lalu diencerkan dengan akuades sampai volume akhir 10 ml sehingga dihasilkan konsentrasi 25, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$ asam galat, secara berturut-turut. Dari masing-masing konsentrasi larutan asam galat dipipet 0,2 ml lalu ditambah 15,8 ml akuades dan 1 ml Reagen Folin-Ciocalteu dan dikocok sampai homogen serta didiamkan selama 8 menit. Ditambahkan 3 ml larutan Na_2CO_3 10% lalu dikocok homogen, dan selanjutnya didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm, lalu dibuat kurva

kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat ($\mu\text{g/ml}$) dengan serapan.

- (iv) Penetapan kandungan fenol total pada ekstrak dengan metoda *Folin–Ciocalteu* (Marjoni, 2015).

Ditimbang 100 mg ekstrak kemudian dilarutkan sampai 10 ml dengan akuades sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/ml. Dari konsentrasi 10 mg/ml dipipet 1 ml dan diencerkan dengan aquades hingga 10 ml dan diperoleh konsentrasi ekstrak 1 mg/ml. Dipipet 0,2 ml ekstrak, ditambahkan 15,8 ml akuades dan 1 ml reagen *Folin–Ciocalteu* lalu dikocok. Didiamkan selama 8 menit kemudian ditambahkan 3 ml Na_2CO_3 10% ke dalam campuran. Didiamkan larutan selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm. Dilakukan 3 (tiga) kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh hasilnya didapat sebagai mg ekuivalen asam galat/ gr sampel segar.

Total Flavonoid (Salmia, 2016)

- (i) Pembuatan larutan kuersetin (0,1 mg/ml)

Sebanyak 10 mg kuersetin (pembanding) ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml etanol 96% sebagai larutan stok.

- (ii) Pengenceran kuersetin

Dibuat pengenceran kuersetin dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$ sebagai larutan kuersetin pembanding.

- (iii) Penetapan panjang gelombang (λ) maksimum kuersetin

Sebanyak 0,5 ml larutan pembanding (kuersetin) diencerkan dengan 1,5 ml metanol kemudian tambahkan aluminium (III) klorida 10%, 0,1 ml Natrium asetat 1 M dan

2,8 ml akuades. Setelah diinkubasi selama 30 menit, absorbansi dari larutan pembanding diukur dengan spektroskopi UV sinar tampak pada panjang gelombang 400-800 nm. Masing-masing larutan pembanding diukur tiga kali. Setelah diperoleh absorbansi. Dari masing-masing larutan pembanding, dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh regresi persamaan linear.

- (iv) Pengukuran kadar flavanoid total pada ekstrak

Sebanyak 20 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml etanol sehingga diperoleh konsentrasi 2000 $\mu\text{g/ml}$. Sebanyak 0,5 ml sampel uji ditambahkan dengan 1,5 ml metanol, kemudian ditambahkan 0,1 ml aluminium (III) klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan 2,8 ml akuades. Setelah diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 436 nm.

c. Pembuatan larutan

Air laut buatan

Pembuatan air laut buatan dilakukan dengan mencampurkan 1 liter air dengan garam ikan sebanyak 35 gr agar didapatkan tingkat salinitas 35‰ sebagai media penetasan telur *Artemia salina* Leach. (Aqiila, dkk., 2017).

Larutan induk

Dari ekstrak kental daun, daging buah dan biji mengkudu yang diperoleh kemudian masing-masing dibuat larutan induk konsentrasi 5000 $\mu\text{g/ml}$, yaitu dengan cara mencampur 500 mg ekstrak kental ditambah air laut buatan sampai volume 100 ml dengan labu takar. Untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak yang efektif membunuh larva *Artemia salina* Leach., setelah dilakukan *trial* atau orientasi didapatkan larutan uji konsentrasi 3, 5, 10, 25, 50, 100 dan 200 $\mu\text{g/ml}$.

d. Penyiapan larva *Artemia salina* Leach.

Penetasan telur *Artemia salina* Leach.

Disiapkan wadah modifikasi untuk penetasan larva udang. Wadah yang sudah siap, diisi dengan 1 liter air laut buatan yang sudah disaring terlebih dahulu. Sebanyak 1 gr telur *Artemia salina* Leach. dimasukkan pada wadah. Nyalakan aerator dan diletakkan di bawah pencahayaan lampu dan dibiarkan sampai 24 jam. Larva *Artemia salina* Leach. yang hidup akan mengendap. Larva *Artemia salina* Leach. yang hidup selanjutnya dipindahkan kedalam gelas piala, dan dibiarkan lagi hingga 24 jam berikutnya dengan tetap berada di bawah pencahayaan lampu, hingga larva *Artemia salina* Leach. berumur 48 jam. Tambahkan larutan ragi 0,006% setelah larva berumur 24 jam.

Pelaksanaan uji toksisitas

Masukkan larva *Artemia salina* Leach. yang telah berumur 48 jam ke dalam masing-masing larutan dari ekstrak daun, daging buah dan biji mengkudu dengan konsentrasi 3 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml dan 200 µg/ml serta larutan kontrol. Masing-masing tabung uji berisi 10 ekor larva *Artemia salina* Leach.. Pada saat yang bersamaan dilakukan juga replikasi dari setiap kelompok perlakuan sebanyak tiga kali. Dalam penelitian ini didapatkan volume akhir setiap tabung uji sebesar 10 ml. Tabung uji kemudian diletakkan di bawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva *Artemia salina* Leach. yang mati.

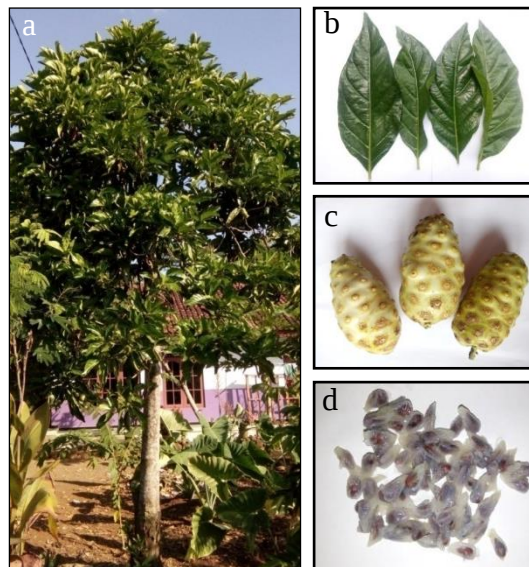
e. Analisis data

Data hasil penelitian akan diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari uji toksisitas tersebut akan dianalisis dengan Analisis Probit menggunakan untuk mengetahui harga LC₅₀.

Efektivitas ekstrak etanol daun, daging buah, dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) dianalisis dengan

melakukan uji statistik parametrik One Way ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 01. (a) pohon, (b) daun, (c) buah dan (d) biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.)

Tanaman mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) yang digunakan dilakukan determinasi di Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang (UNNES) untuk mengidentifikasi suku dan spesies tanaman yang akan diteliti, sehingga menghindari adanya kesalahan dalam pengambilan tanaman yang digunakan dalam penelitian.

Simplisia daun, daging buah dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) diekstraksi dengan metode maserasi. Metode maserasi dipilih karena merupakan cara penyarian yang sederhana dengan menggunakan peralatan sederhana dan tanpa adanya tahap pemanasan sehingga menghindari terjadinya kerusakan kandungan senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak (Ramdhini, 2010). Seperti yang dikemukakan oleh Williamson, dkk., (1996)

Pada penelitian ini dilakukan uji pendahuluan total fenol dan total flavonoid. Pemeriksaan kandungan senyawa fenol dan flavonoid total menjadi salah satu dasar dalam pengujian aktivitas anti-kanker, karena

diketahui bahwa senyawa fenolat merupakan salah satu faktor penting dalam aktivitas sitotoksik suatu senyawa dengan adanya gugus OH yang terikat pada cincin aromatik (Fitrya, 2009).

Tabel 01. Kandungan total fenol daun, daging buah, dan biji mengkudu

Sampel	Total fenol (mg GAE/g ekstrak) ± SD
Daun	64,33 ± 9,02
Daging buah	46,00 ± 5,00
Biji	87,00 ± 8,62

Hasil dari penentuan kandungan senyawa fenolat, diketahui bahwa sampel biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) memiliki kandungan senyawa fenolat tertinggi yaitu sebesar 87,00 mg GAE/g ekstrak dibandingkan dengan sampel daun dan buah mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.).

Tabel 02. Kandungan total flavonoid daun, daging buah, dan biji mengkudu

Sampel	Kandungan total flavonoid (mg QE/g ekstrak) ± SD
Daun	13,33 ± 0,51
Daging buah	3,93 ± 0,51
Biji	6,50 ± 0,56

Hasil dari penentuan kandungan senyawa flavanoid, diketahui bahwa sampel daun mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) memiliki kandungan senyawa flavanoid tertinggi yaitu sebanyak 13,33 mg QE/g ekstrak dibandingkan dengan sampel daun dan buah mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.).

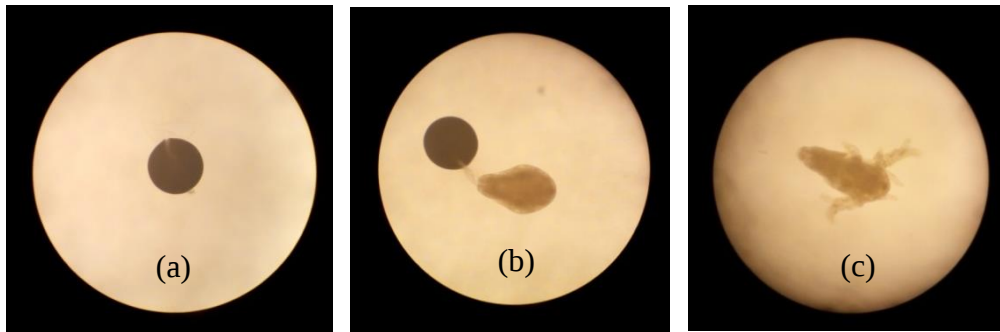
Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan metode skrining dengan menggunakan hewan uji larva *Artemia salina* Leach. yang dapat digunakan sebagai

bioassay yang sederhana untuk meneliti toksisitas akut suatu senyawa dengan cara menentukan nilai LC_{50} (Meyer, dkk., 1982).

Artemia salina Leach. hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 15-300 ‰). Suhu yang berkisar antara 25-30°C, oksigen terlarut sekitar 3 mg/L, dan pH antara 7,3–8,4. Sebagai plankton, *Artemia salina* Leach. tidak dapat mempertahankan diri terhadap musuh-musuhnya, karena tidak mempunyai cara maupun alat untuk mempertahankan diri. Satu-satunya kondisi yang menguntungkan dari alam adalah lingkungan hidup yang berkadar garam tinggi, karena pada kondisi tersebut pemangsanya pada umumnya sudah tidak dapat hidup lagi (Mudjiman, 1995). Kemampuan adaptasi yang baik inilah yang menyebabkan *Artemia salina* Leach. digunakan sebagai uji pendahuluan terhadap efek toksisitas dari suatu bahan (Fathiyawati, 2008). Disamping itu, *Artemia salina* Leach. digunakan sebagai hewan uji dalam metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) karena memiliki respon yang sama dengan mamalia sehingga senyawa maupun ekstrak yang memiliki aktivitas pada sistem tersebut dapat terdeteksi. Disamping itu larva *Artemia salina* Leach. juga identik dengan sel kanker yang membelah secara mitosis (Kurniawan, 2009).

Dalam penelitian ini digunakan larva *Artemia salina* Leach. yang berumur 48 jam setelah penetasan karena memiliki saluran pencernaan yang sudah terbentuk lengkap sehingga sensitif terhadap suatu zat yang diberikan (Panjaitan, 2011).

Uji toksisitas ini dilakukan dengan 3 kali replikasi (triplo) pada masing-masing perlakuan untuk. Total kematian dan persentase kematian larva *Artemia salina* Leach. ditunjukkan pada **tabel 03** dan **gambar 03**.

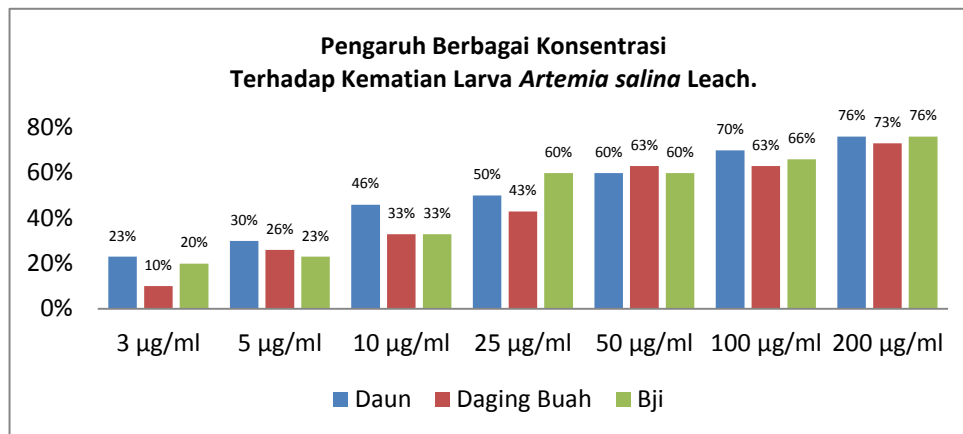


Gambar 02. Penampakan mikroskopik (a) kista, (b) tahap payung dan (c) nauplius dengan perbesaran 25 kali.

Tabel 03. Kematian *Artemia salina* Leach. setelah pemberian ekstrak daun, daging buah, dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.)*

Sampel mengkudu	Konsentrasi (µg/ml)	Kematian larva <i>Artemia salina</i> Leach. (ekor)		
		Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III
Daun	0	0	0	0
	3	2	2	3
	5	2	3	4
	10	5	4	5
	25	6	4	5
	50	6	6	6
	100	7	7	7
	200	8	7	8
Daging buah	0	0	0	0
	3	1	1	1
	5	3	2	3
	10	3	3	4
	25	4	4	5
	50	6	7	6
	100	7	6	6
	200	8	7	7
Biji	0	0	0	0
	3	2	2	2
	5	2	3	2
	10	4	4	2
	25	6	6	6
	50	6	5	7
	100	7	6	7
	200	8	7	8

*) jumlah larva awal 10 ekor setiap konsentrasi



Gambar 03. Pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak daun, daging buah dan biji mengkudu terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach.

Pada grafik di atas dapat dilihat bahwa persentase kematian larva *Artemia salina* Leach. terendah berada pada konsentrasi 3 µg/ml. Sedangkan persentase kematian larva *Artemia salina* Leach. tertinggi berada pada konsentrasi 200 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin tinggi pula persentase kematian larva.

Hasil nilai persentase kematian yang didapatkan selanjutnya dianalisis metode probit untuk didapatkan persamaan regresi linier dan diketahui nilai LC_{50} .

Tabel 04. Nilai mortalitas (LC_{50}) *Artemia salina* Leach.

Sampel	LC_{50} (µg/ml) ± SD
Daun	25,32 ± 4,145
Daging Buah	35,56 ± 4,174
Biji	27,23 ± 3,746

Pengujian terhadap ekstrak etanol daun, daging buah dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) masing-masing menunjukkan harga $LC_{50} < 1000$ µg/ml. Sehingga dapat dikatakan ekstrak etanol daun, daging buah dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) pada percobaan ini memiliki toksisitas dan berpotensi sebagai anti-kanker menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Analisis statistik nilai LC_{50} pada sampel daun, daging buah dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) dilakukan dengan metode *one way ANOVA* menggunakan aplikasi SPSS dengan tingkat signifikansi

0,05 (5%) Hasil uji statistik menunjukkan nilai signifikansi $< 0,05$ yaitu sebesar 0,044 yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai LC_{50} pada masing-masing sampel daun, daging buah dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.).

4. SIMPULAN

Hasil uji toksisitas ekstrak etanol daun, daging buah dan biji mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) ketiganya menunjukkan toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach. dengan nilai $LC_{50} < 1000$ µg/ml.

Daun mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn.) memiliki toksisitas tertinggi terhadap larva *Artemia salina* Leach. dengan nilai LC_{50} sebesar 25,32 µg/mL diikuti dengan biji dan daging buah dengan nilai LC_{50} sebesar 27,23 µg/ml dan 35,56 µg/ml.

5. REFERENSI

- Aquila, Gusti Rifda. Taufiqurrahman, Irham. Wydiamaka, Erida. 2017. Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Ramanian (*Bouea macrophylla* Griffith) Terhadap Mortalitas Larva *Artemia salina* Leach.. Banjarmasin: Fakultas Kesehatan Gigi Universitas Lambung Mangkurat. *Dentino (Jurnal Kedokteran Gigi)*, Vol II:170-176.
- Ariyanto, Wawan. 2016. Daya Hambat Ekstrak Biji Mengkudu Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus*

- Mutans. Jurnal Kesehatan Gigi* Vol. **03** No.1, Juni 2016.
- Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravaloz MD. 2002. Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *Jurnal BMC Biotechnology*. **2**:1472-6570.
- Fathiyawati. 2008. Uji toksisitas ekstrak daun *Ficus recemosa* L terhadap *Artemia salina* Leach. dan profil kromatografi lapis tipis. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Fitrya. Anwar, Lenny. 2009. Uji Aktivitas Antikanker Secara In Vitro dengan Sel Murine P-388 Senyawa Flavonoid dari Fraksi Etilasetat Akar Tumbuhan Tunjuk Langit (*Helminthostachis Zeylanica* (Linn) Hook). Sumatra Selatan: Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Sriwijaya. *Jurnal* Volume **12** (1) C 12106.
- Hirazumi, A., E. Furusawa, S.C. Chou, and Y. Hokama. 1999. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumor activity. *Phytochem. Research*. **13** :380-387.
- Juhaeriah E. 2013. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Paku Pedang (*Nephrolepis Falcata*) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode BSLT. *Skripsi*. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Hal: 14-21.
- Kurniawan H. 2009. Uji toksisitas akut ekstrak metanol daun kesum (*Polygonum minus* Huds) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode brine shrimp lethality test (bslt). *Skripsi*. Pontianak: Universitas Tanjungpura
- Marjoni, Mhd Riza., Afrinaldi, Novita, Ari Devi. 2015. Total Content of Fenol and Antioxidant Activity of The Aqueous Extract of Cherry Leaf (*Muntingia calabura* L.). *Jurnal Kedokteran Yarsi* **23** (3) : 187-196.
- Meyer BNNR, Ferrigni ML. 1982. Brine Shrimp, a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Plant Medical Research*. **45**:31-34.
- Mudjiman, A. 1995. *Makanan Ikan*. Jakarta: PT. Penerbit Swadaya.
- Nirawati, Cut. 2016. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Dan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* Sebagai Penunjang Praktikum Mata Kuliah Mikrobiologi. *Skripsi*. Banda Aceh: Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Darussalam.
- Panjaitan, RB. 2011. Uji toksisitas akut ekstrak kulit batang pulasari (*Alyxiae cortex*) dengan metode Brine Shrimp Lethality Test. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Ramdhini, Rizki Nisfi. 2010. Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach.. dan Toksisitas Akut Komponen Bioaktif *Pandanus conoideus* var. *conoideus* Lam. Sebagai Kandidat Antikanker. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Salmia. 2016. Analisis Kadar Flavonoid Total Ekstrak Kulit Batang Kedondong Bangkok (*Spondias dulcis*) Dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Skripsi*. Makassar: Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Waterhouse A 1999. Folin-Ciocalteu micro method for total phenol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. California: University of California.
- Williamson, E.M., David, T.T., & Fred. 1996. *Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*. England: Wiley & Sons Ltd.