

## UJI FITOKIMIA DAN TOKSISITAS MINYAK ATSIRI DAUN PALA (*Myristica fragrans* Houtt) DARI PULAU LEMUKUTAN

Olyvia Eka Puspa<sup>1\*</sup>, Intan Syahbanu<sup>1</sup>, Muhamad Agus Wibowo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Progam Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura,

Jln. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi 78124, Pontianak

\*email: olyviaekapuspa.OEP@gmail.com

### ABSTRAK

*Pala (Myristica fragrans Houtt) merupakan salah satu tanaman obat dari Indonesia yang sering digunakan sebagai bahan penyegar dan obat-obatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dan toksisitas minyak atsiri daun pala. Minyak Atsiri daun pala diekstraksi menggunakan metode destilasi uap-air. Rendemen minyak atsiri yang diperoleh sebesar 0,60222% dengan warna kuning bening, berbau khas minyak pala dengan indeks bias sebesar 1,475 dan berat jenis sebesar 0,8534 g/mL. Hasil identifikasi GC-MS menunjukkan bahwa minyak atsiri daun pala mengandung 7 komponen senyawa utama yaitu Limonene (25,73%), Diisooctyl Adipate (15,63%),  $\alpha$ -Terpinolene (11,44%), delta. 3-Carene (10,79%), 1,3-Benzodioxole (8,06%), 3-Cyclohexene-1-ol (7,94%) dan Sabinene (7,70%). Hasil uji fitokimia pada minyak atsiri daun pala mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, dan saponin dan toksisitas minyak atsiri daun pala terhadap Larva A. salina menunjukkan hasil dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 5,192 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa minyak atsiri daun pala bersifat toksik.*

**Kata kunci:** Pala (*Myristica fragrans* Houtt), minyak atsiri, uji fitokimia, toksisitas

### PENDAHULUAN

Pala (*Myristica fragrans* Houtt) termasuk salah satu tanaman dalam famili *Myristicaceae*. Akibat nilainya yang tinggi sebagai rempah-rempah, buah dan biji pala telah menjadi komoditi perdagangan yang penting sejak masa Romawi. Biji pala mengandung minyak atsiri 7-14%. Bubuk pala dipakai sebagai penyedap untuk roti atau kue, puding, saus, sayuran, dan minuman penyegar. Minyaknya juga dipakai sebagai campuran parfum atau sabun (Preedy *et al*, 2011). Masyarakat negara India menggunakan biji pala sebagai obat antikembung, narkotik, dan sebagai sarana untuk menginduksi menstruasi, wasir, muntah kronis, rematik, kolera, psikosis, kram perut dan mual. Minyak biji pala juga bersifat sebagai antiseptik, analgesik, dan sifat antirematik (Gupta and Deepak, 2011).

Salah satu metode pengujian sifat toksisitas dari suatu bahan atau senyawa adalah metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Anderson, 1991). Toksisitas dengan metode BSLT ini merupakan salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksis dari bahan alam

dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat, yaitu rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji.

Komponen-komponen yang terdapat didalam minyak pala antara lain  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, Myrcene,  $\alpha$ -phellandrene,  $\alpha$ -terpinene, Limonene, P-cymene, Linalool, Terpene-4-ol, dan  $\alpha$ -terpineol (Agoes, 2010). Hasil uji fitokimia ekstrak metanol daun pala mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid dan tanin, sedangkan ekstrak etil asetat mengandung senyawa alkaloid, flavonoid dan terpenoid. (Ginting, dkk, 2014). Hasil uji aktivitas sitotoksik ekstrak etil asetat, total flavonoid metanol, dan n-heksan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) berturut-turut LC<sub>50</sub> 15,34 ppm; 30,92 ppm; 89,72 ppm dan 118,00 ppm (Ginting, dkk, 2014).

Daun pala merupakan salah satu penghasil minyak atsiri. Minyak atsiri merupakan salah satu bahan alami yang dapat digunakan untuk mengobati infeksi terhadap bakteri. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan isolasi minyak atsiri dari daun pala dari Pulau Lemukutan dengan destilasi uap-air, kemudian dianalisis komponen-komponen kimia

minyak atsiri daun pala tersebut menggunakan GC-MS, uji fitokimia dan toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah seperangkat alat destilasi, pompa air akuarium, seperangkat alat *Artemia salina* Leach, gelas beaker, botol semprot, botol vial, bulb, kaca arloji, mikro pipet 1000  $\mu$ L dan 100  $\mu$ L dll.

Bahan-bahan yang digunakan diantaranya adalah Akuades ( $H_2O$ ), Air laut, Asam Sulfat ( $H_2SO_4$ ), Asam Asetat Glisial, *Artemia Salina* Leach, Natrium Sulfat ( $Na_2SO_4$ ), N-Heksan, Pereaksi Dragendroff, Pereaksi Mayer, Pereaksi Wagner dan Tween 80.

### Prosedur Penelitian Isolasi Minyak Atsiri

Daun pala dicuci sampai bersih agar kotoran-kotoran seperti debu yang menempel dapat hilang. Kemudian sampel ditimbang sebanyak 2 kg didestilasi dengan destilasi uap-air dan ditampung destilat yang didapat lalu ditambahkan dengan  $Na_2SO_4$  anhidrat untuk menyerap air yang masih terdapat dalam minyak atsiri. Persen rendemen dan massa jenis minyak ditentukan serta minyak atsiri daun pala dianalisis dengan instrumen GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spektrometry*).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat minyak (g)}}{\text{berat daun pala (g)}} \times 100\%$$

$$\text{berat jenis} = \frac{m_2 - m}{m_1 - m}$$

Keterangan:

m= massa piknometer kosong

$m_1$ = massa piknometer berisi air

$m_2$ = massa piknometer berisi minyak

### Uji Flavonoid

Minyak daun pala dimasukkan ke dalam tabung reaksi 3-7 tetes, kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan asam sulfat pekat ( $H_2SO_4$ ). Diamati perubahan warna yang terjadi, jika larutan berubah warna menjadi merah tua atau kuning menandakan adanya senyawa flavonoid (Harbone, 1987).

### Uji Saponin

Minyak daun pala sebanyak 3-7 tetes dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 mL air ( $H_2O$ ). Larutan dikocok selama 30 detik, busa yang terbentuk menunjukkan adanya saponin. Larutan didiamkan beberapa menit, jika busa masih stabil antara 1-10 cm menandakan adanya senyawa saponin (Harbone, 1987).

### Uji Fitokimia

#### Uji Alkaloid

Minyak daun pala diambil sebanyak kurang lebih 2 mL dan ditambahkan dengan 1 mL asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 2N lalu dipanaskan selama 30 menit. Didiamkan sampai larutan memisah, lapisan asam sulfat diambil dan dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung 1 ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner, hasil positif ditandakan dengan adanya endapan cokelat. Tabung 2 ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, hasil positif ditandakan dengan adanya endapan putih. Tabung 3 ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff, hasil positif ditandakan dengan adanya endapan jingga (Harbone, 1987).

#### Uji Steroid dan Terpenoid

Minyak daun pala sebanyak 3-7 tetes dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 1-2 tetes larutan asam asetat glisial dan 1-2 tetes larutan asam sulfat pekat ( $H_2SO_4$ ). Warna larutan yang berubah biru atau ungu menandakan adanya senyawa steroid, sedangkan perubahan warna larutan menjadi merah atau jingga menandakan adanya senyawa terpenoid (Harbone, 1987).

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

#### a. Penetapan Larva *Artemia salina* Leach

Larva *A. salina* Leach ditimbang kurang lebih 50 mg dan dimasukan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 1000 mL air laut yang sudah disaring, kemudian dipasang aerator. Biarkan selama 48 jam dengan pencahayaan lampu agar menetas sempurna. Larva yang sudah menetas diambil ke dalam botol percobaan dan diberi ekstrak sesuai perlakuan.

**b. Persiapan sampel dan Uji Bioaktivitas**

Pembuatan larutan induk 2000 ppm. Sebanyak 50 µL sampel minyak daun pala dilarutkan dalam 25 mL air laut. Untuk sampel yang sukar larut, dapat ditambahkan dengan Tween 80 (1-3 tetes) untuk meningkatkan kelarutan. Konsentrasi 1000 ppm dibuat dengan mengambil 2,5 mL larutan induk 2000 ppm dan dimasukkan kedalam botol vial yang sudah ditandai (5mL), kemudian ditambahkan 10 ekor larva udang *A. salina* Leach dan air laut sampai tanda batas 5 mL. Konsentrasi 100 ppm dibuat dengan diambil 250 µL larutan induk 2000 ppm, kemudian ditambahkan 10 ekor larva udang *A. salina* Leach dan air laut sampai tanda batas 5 mL. Larutan sampel 10 ppm dibuat dengan cara memasukkan 25 µL larutan induk 2000 ppm, kemudian ditambahkan 10 ekor larva udang *A. salina* Leach dan air laut sampai tanda batas 5 mL.

Untuk konsentrasi 5; 2,5 dan 1 ppm dibuat larutan induk 100 ppm, yaitu dengan mengambil 0,5 mL larutan induk 2000 ppm dan dilarutkan dengan air laut sampai tanda batas volume 10 mL. Konsentrasi 5 ppm dibuat dengan mengambil 250 µL larutan induk 100 ppm, kemudian ditambahkan 10 ekor larva udang *A. salina* Leach dan air laut sampai tanda batas 5 mL. Larutan sampel 2,5 ppm dibuat dengan cara memasukkan 125 µL larutan induk 100 ppm, kemudian ditambahkan 10 ekor larva udang *A. salina* Leach dan air laut sampai tanda batas 5 mL. Larutan sampel 1 ppm dibuat dengan cara memasukkan 50 µL larutan induk 100 ppm, kemudian ditambahkan 10 ekor larva udang *A. salina* Leach dan air laut sampai tanda batas 5 mL.

Untuk setiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan (triplo). Sebagai kontrol adalah air laut yang tidak diberi sampel. Botol pengujian disimpan dibawah pencahayaan lampu, pengamatan dilakukan setelah 24 jam. Jumlah larva udang yang mati dicatat kemudian dihitung persentase kematiannya. Persamaan persentase kematian:

$$\% \text{ Mortalitas} = \left( \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva total}} \right) \times 100\% .$$

**HASIL dan PEMBAHASAN****Isolasi Minyak Atsiri**

Isolasi minyak atsiri dari daun pala yang dilakukan menggunakan alat destilasi uap-air menghasilkan rendemen sebesar 0,60204 %. Minyak atsiri yang diperoleh berwarna kuning pucat dengan aroma khas pala yang tajam serta memiliki massa jenis 0,8534 gr/mL. Minyak atsiri daun pala dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Minyak Pala

Minyak atsiri daun pala memiliki 33 komponen penyusun dimana terdapat 7 komponen utama pada minyak atsiri daun pala, yaitu limonene, diisooctyl adipate, α-terpinolene, delta.-3-carene, 1,3-benzodioxole, 3-cyclohexene-1-ol dan sabinene.

**Uji Fitokimia**

Uji fitokimia dilakukan secara kualitatif, dengan mengidentifikasi senyawa tersebut yang didasarkan pada perubahan warna pada sampel.

Hasil uji fitokimia pada Tabel 2. menunjukkan bahwa minyak atsiri daun pala positif mengandung senyawa terpenoid, flavonoid dan saponin.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Minyak Atsiri Daun Pala

No.	Uji Fitokimia	Sampel Minyak Pala
1.	Alkaloid	
	a. Mayer	-
	b. Wagner	-
	c. Dragendroff	-
2.	Flavonoid	+
3.	Saponin	+
4.	Steroid	-
5.	Terpenoid	+

Keterangan: (-)= tidak terdeteksi, (+)= terdeteksi.

Berdasarkan uji alkaloid yang dilakukan, minyak daun pala ditambahkan dengan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) lalu dipanaskan dalam air mendidih selama 30 menit. Penambahan  $H_2SO_4$  ini berfungsi untuk membentuk garam alkaloid, karena alkaloid yang bersifat basa dapat larut dalam pelarut yang bersifat asam. Pemanasan dalam uji alkaloid cukup lama yaitu 30 menit yang bertujuan untuk membentuk garam alkaloid yang stabil. Filtrat yang didapat kemudian diuji dengan pereaksi Dragendroff, Mayer dan Wagner. Pada uji alkaloid menunjukkan hasil negatif untuk semua pereaksi.

Menurut Harborne (1987) bahwa kandungan terpenoid atau steroid dalam tumbuhan diuji dengan menggunakan metode Liebermann-Buchard yang nantinya akan memberikan warna jingga untuk terpenoid dan warna biru atau ungu untuk steroid. Pada uji ini ditambahkan 1-2 tetes asam asetat glasial, penambahan ini bertujuan untuk memutuskan gugus steroid-terpenoid dengan gugus lainnya dan ditambahkan asam sulfat pekat ( $H_2SO_4$ ), tujuan penambahan  $H_2SO_4$  ini untuk memutuskan ikatan gula pada senyawa. Jika ikatan gula terlepas maka adanya steroid-terpenoid bebas pada sampel akan ditandai dengan adanya cincin yang berwarna merah.

Uji ini didasarkan pada kemampuan senyawa terpenoid dan steroid membentuk warna oleh  $H_2SO_4$  pekat dan pada pelarut asetat glasial yang membentuk warna jingga. Berdasarkan hasil uji fitokimia, diketahui bahwa minyak daun pala mengandung senyawa terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga dan adanya cincin merah pada minyak pala. Kristanti *et al.*, (2008) dan Harborne (1987), menyatakan bahwa senyawa terpenoid memiliki struktur siklik yang bisa berikatan dengan alkohol. Hal ini terlihat dari perubahan warna yang terjadi setelah penambahan asam sulfat pekat, yaitu warna jingga. Pada uji steroid menunjukkan hasil negatif, karena tidak terjadi perubahan warna biru.

Uji flavonoid dilakukan dengan menambahkan minyak daun pala dengan asam sulfat pekat ( $H_2SO_4$ ). Penambahan asam sulfat pekat ini bertujuan untuk pembentukan senyawa flavonoid (pembentukan garam flavilium) dengan

ditunjukkan nya perubahan warna jingga pada larutan. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa minyak daun Pala memiliki kandungan senyawa flavonoid, hal ini ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi jingga.

Uji senyawa saponin dapat dilakukan dengan metode Forth dimana dalam sampel menghasilkan buih yang stabil setelah beberapa detik dikocok. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Miryanti *et al.*, (2011), menunjukkan bahwa sampel yang mengandung saponin akan menimbulkan buih dalam air pada suasana asam setelah dikocok lebih dari 10 menit. Hal ini, kemungkinan disebabkan adanya glikosida yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya dalam air. Hasil penelitian ini hampir sama dengan metode yang dilakukan oleh Kristanti *et al.*, (2008) dan Marlina *et al.*, (2005) busa yang dihasilkan lebih 10 menit setelah dikocok selama 10 menit. Untuk uji ini minyak pala positif mengandung saponin dengan ada terbentuknya busa. Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Rusdi, 1990).

Berdasarkan Tabel 2. menunjukkan hasil uji fitokimia minyak atsiri daun pala mengandung senyawa terpenoid, flavonoid, alkaloid dan saponin. Senyawa terpenoid merupakan intensitas yang paling tinggi, hal ini sesuai dengan hasil instrumen GCMS. Dari hasil GCMS yang didapat diperoleh senyawa Limonene yang merupakan salah satu golongan yang termasuk ke dalam golongan terpenoid yang terdapat dalam hasil uji fitokimia. Limonen memiliki kandungan terbesar karena merupakan suatu bahan aktif yang paling berperan dari senyawa yang dikandung dalam minyak atsiri daun pala. Senyawa limonene berfungsi melancarkan peredaran darah, meredakan radang tenggorokan, batuk, dan bisa menghambat pertumbuhan sel kanker.

#### **Toksistas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)**

Pengujian toksistas dapat dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) (Meyer *et al.*, 1982

dan Ruwaida, 2010). Hasil toksisitas minyak atsiri daun pala terhadap larva *A. salina* Leach dan nilai pengukuran nilai  $LC_{50}$  menggunakan BSLT terdapat pada Tabel 4.

Tabel 3. Hasil Uji Toksisitas Minyak Atsiri Daun Pala dengan Metode BSLT

Sampel	$LC_{50}$ (ppm)
Minyak daun Pala	5,192

Keterangan:  $LC_{50}$  = Konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian

Tabel 4. Hasil uji toksisitas ekstrak metanol, etil asetat, *n*-heksana, dan total flavonoid dengan metode BSLT (Ginting, dkk, 2014)

Ekstrak Daun Pala	$LC_{50}$ (ppm)
Metanol	89,72
Ekstrak Etil Asetat	15,34
Ekstrak <i>n</i> -Heksan	118,00
Total Flavonoid	30,92

Berdasarkan Tabel 3. dapat dilihat bahwa minyak daun pala memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 5,192 ppm. Menurut Ginting, dkk, 2014, pada Tabel 4. menunjukkan hasil uji toksisitas ekstrak daun pala, pada penelitian tersebut didapat nilai  $LC_{50}$  untuk ekstrak *N*-Heksan, metanol, total flavonoid dan ekstrak etil asetat berturut-turut sebesar 118,00; 89,72; 30,92 dan 15,34 ppm. Dari hasil  $LC_{50}$  yang didapat menunjukkan hasil  $LC_{50}$  yang berbeda, hal ini terjadi dikarenakan pada penelitian ini untuk uji toksisitas digunakan minyak atsiri daun pala sedangkan penelitian Ginting, dkk, 2014 menggunakan ekstrak daun pala, perlakuan tersebut yang menyebabkan hasil  $LC_{50}$  yang didapat berbeda.

Dari hasil penelitian ini maka dapat dikatakan bahwa sampel minyak daun pala bersifat toksik, sedangkan untuk ekstrak *N*-Heksan tidak bersifat toksik dimana suatu sampel dikatakan toksik berdasarkan metode BSLT menurut Meyer *et al.*, 1982 dengan nilai  $LC_{50}$  1-100 ppm dan untuk metanol, ekstrak etil asetat dan total flavonoid bersifat toksik karena nilai  $LC_{50}$  kurang dari 100 ppm. Pada manusia, senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik pada kadar tertentu, dapat mengakibatkan gangguan pada sistem

metabolisme tubuh, dimana senyawa aktif tersebut dapat menjadi inhibitor pada enzim sehingga mengganggu proses replikasi DNA. Fase pertumbuhan larva *A. salina* Leach yang digunakan dalam penelitian ini adalah fase *nauplius*, karena pada fase *nauplius* merupakan fase yang paling aktif membelah secara mitosis, hal tersebut identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis (Mudjiman, 1988).

Sifat toksik dari suatu tanaman berkaitan dengan kandungan senyawa aktif di dalamnya. Dari hasil uji fitokimia sebelumnya menunjukkan bahwa minyak daun pala positif mengandung terpenoid, flavonoid, alkaloid dan saponin. Senyawa-senyawa tersebut diduga toksik pada kadar tertentu. Cara kerjanya adalah bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Akibatnya, larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan. Proses tersebut, berlangsung selama 24 jam sehingga menyebabkan kematian larva *A. salina* Leach sebanyak 50% (Ruwaida, 2010).

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kualitas minyak atsiri daun pala yang didapat, yaitu nilai indeks bias 1,475 sesuai dengan SNI 06-2388-2006 dan dari hasil uji toksisitas menunjukkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 5, 192 ppm dan dapat dikatakan minyak atsiri daun pala bersifat toksik dengan ditunjukkan hasil fitokimia yaitu minyak atsiri daun pala mengandung senyawa terpenoid, flavonoid dan saponin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, H. A., 2010. *Tanaman Obat Indonesia Buku 2*. Jakarta: Penerbit Salemba Medika.
- Anderson, C. M. Goetz and J. L. McLaughlin, 1991. *A Blind Comparison of Simple Bench-top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens*. Phytochemical Analisis. Vol.2 (107) I-II.

- Ginting, B., Barus, T., Marpaung, L., Simanjuntak, P., 2014. *Prosiding Seminar Nasional Kimia 2014*. Universitas Sumatera Utara.
- Harbone, J. B., 1987. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terbitan Kedua. Terjemahan: Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. ITB: Bandung.
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B., 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Unair Press. Surabaya.
- Marliana, S. D., Suryani, V., dan Suyono, 2006. *Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (Sechium edule Jack. Swartz) dalam Ekstrak Etanol*. Biofarmasi. 3 (1): 26-31.
- Meyer, B. N., Ferigni, N. R., Putman, J. E., Jacobson, L. B., Nichols, D. E., and McLaughlin, J. L., 1982. *Brine Shrimps a Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. *Planta Medica*. 45, 34.
- Miryanti, Y. I. P. A., Sapei, L., Budiono, K., dan Indra, S., 2011. *Ekstraksi Antioksidan dari Kulit Buah Manggis (Garcinia Mangostana L.)*. Universitas Katolik. Bandung. (Skripsi).
- Mudjiman, A., 1988. *Udang Renik Asin (Artemia salina)*. Bhatara Karya. Aksara: Jakarta.
- Rusdi, D., 1990. *Kimia Bahan Alam*. Universitas Andalas: Padang.
- Ruwaida, D. G., 2010. *Uji Toksisitas Senyawa Hasil Isolasi Rumput Mutiara (Chedyoris Corymbosa L.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*. Skripsi. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.