



**UJI TOKSISITAS DAN PROFIL FTIR EKSTRAK METANOL SPONS  
*Niphates olemda* ASAL PULAU SAMALONA KEPULAUAN SPERMONDE  
(TOXICITY AND FTIR PROFILE OF SPONS METHANOL EXTRACT OF  
*Niphates olemda* FROM SAMALONA ISLANDS OF SPERMONDE  
ARCHIPELAGO)**

Ajuk Sapar<sup>1\*</sup>, Alfian Noor<sup>2</sup>, Nunuk Hariani Soekamto<sup>2</sup>, Ahyar Ahmad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia FMIPA Universitas Tanjungpura, Pontianak, 78124

<sup>2</sup>Departemen Kimia FMIPA Universitas Hasanuddin, Makassar, 90245

\*Corresponding author: [ajuk.sapar@chemistry.untan.ac.id](mailto:ajuk.sapar@chemistry.untan.ac.id)

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 20 July 2020

Accepted 30 July 2020

Available online

31 July 2020

##### Keywords:

Sponge, *Niphates olemda*, Spermonde, FTIR, toxicity

#### ABSTRACT

Preliminary research including toxicity testing, phytochemical test, and FTIR analysis of methanol extracts from sponge species *Niphates olemda* has been carried out. Small scale extraction was carried out on 23 g of the wet sponge sample using methanol and obtained as much as 40.3 mg of methanol extract. The results of the toxicity test using the BSLT method using *Artemia salina* showed that the *Niphates olemda* extract was toxic with LC<sub>50</sub> value of 87.5 ppm. The phytochemical test results show that the methanol extract contains steroids and terpenoids. FTIR profile of methanol extract *Niphates olemda* indicated the presence of the main functional groups, namely C=O, OH, C=C, =CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, and C-O.

© 2020 IJoPAC. All rights reserved

## 1. Pendahuluan

Spons sebagai obyek penelitian yang merupakan *animal metazoa* (hewan primitif) yang memiliki kemampuan berkompetisi dengan baik<sup>[1]</sup>, bahkan mampu hidup pada kondisi lingkungan yang ekstrim sekalipun, dan kemampuan memodifikasi nutrient menjadi bahan aktif yang berperan sebagai protector terhadap predator<sup>[2]</sup>. Spons memiliki kemampuan berkompetisi yang baik sehingga sangat menarik diteliti baik dari aspek kandungan kimianya maupun ekologiannya<sup>[3]</sup>. Temuan beberapa spesies yang terdapat di Suleawesi Selatan dan tingginya tingkat keragaman spesies spons yang ada di Spermonde diduga kuat terdapat metabolit sekunder yang beragam dan memiliki beragam bioaktivitas menarik seperti antikanker, antiviral, antimikroba, dan lain-lain. Kelompok metabolit sekunder yang banyak ditemui pada spons maupun mikrosimbiotanya adalah steroid, terpenoid, alkaloid, dan fenolik.

Salah satu spesies spons yang menunjukkan aktivitas menghambat interaksi p53-Hdm2 yaitu *Niphates olemda*. Senyawa niphateolide A yang diisolasi dari spons *Niphates olemda* diperoleh dari Mantehage, Sulawesi Utara, Indonesia merupakan senyawa dengan kerangka diterpen dengan rumus molekul C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub><sup>[4]</sup>. Pada spesies *Niphates olemda* yang diambil dari perairan Banyuwangi, Indonesia juga menunjukkan aktivitas berbeda yaitu menghambat dengan kuat aktivitas enzim acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE)<sup>[5]</sup>. Tidak hanya spons sebagai host bagi mikroorganisme yang memiliki bioaktivitas, jenis fungi *Curvularia lunata* yang bersimbiosis pada spons *Niphates olemda* asal Indonesia juga menghasilkan metabolit sekunder seperti 1,3,8-trihydroxy-6-methoxyanthraquinone (lunatin), (+)asam abscisat dan bisanthraquinone cytoskyrin A

termodifikasi yang ternyata aktif terhadap *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*<sup>[6][7]</sup>. Spesies *Niphates olemda* juga ditemukan di Perairan Pulau Samalona, Kepulauan Spermonde, Indonesia. Berdasarkan temuan beberapa senyawa metabolit sekunder dari spons *Niphates olemda* dan mikrosimbiotnya di atas, maka sampel spons dari Kepulauan Spermonde punya potensi diteliti untuk mendapatkan metabolit sekunder yang beragam dengan aktivitas berbeda. Namun artikel ini merupakan studi pendahuluan yang meliputi taksonomi, uji toksistas, uji fitokimia dan penentuan profil FTIR ekstrak metanol dari *Niphates olemda*.

## 2. Metode

### 2.1. Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan terdiri atas metanol Pro Analyst (Merck), Dimetil Sulfoksida (DMSO) Pro Analyst (Merck), etilasetat Grade (Merck), kloroform grade (MERCK), metanol Grade (MERCK), reagen Dragendorff, Mayer, Wagner, Liebermen-Burchard, silika gel60 MERCK (0,2-05 mm), Merck, Whatmant paper (41), Asam Asetat anhidrida Pro Analyst (Merck), Chloroform Pro Analyst (Merck), KBr pellet. Alat yang digunakan terdiri atas chamber, neraca analitik (neraca analitik (Mettler AE 100 dan PM200)), rotary evaporator (Heidolph 4000), Spektrofotometer Fourier Transform Infra-Red (FTIR, IRPrestige-21 Shimadzu).

### 2.2. Animal material

Jenis sampel penelitian adalah spons yang diambil dari Perairan Pulau Samalona Kepulauan Spermonde, Sulawesi Selatan, Indonesia pada koordinat 05°07'26,9" LS dan 119°20'38,3" BT dan diberi kode SML-06. Sampel diambil dengan cara SCUBA Diving pada kedalaman 8 m. Lokasi sampel ditempuh dalam waktu 45 menit dari Kota Makassar menggunakan perahu motor. Teknik pengambilan sampel spons tetap memperhatikan kelestarian lingkungan dengan hanya mengambil pada satu lokasi untuk satu spesies. Sampel yang dipilih adalah yang berukuran paling besar diantara jenis spons yang sama karena diduga memiliki bioaktivitas tinggi sehingga bisa bertahan hidup lebih lama terhadap predator<sup>[8]</sup>. Sampel dibersihkan dari material lainnya seperti serpihan karang, hewan, tumbuhan, pasir dan lain-lain yang terikut pada sponge kemudian kemudian dibilas menggunakan air bersih, dikemas dalam wadah plastik yang telah diberi label dan selanjutnya disimpan dalam *cool box* yang ada di lapangan dan selanjutnya disimpan dalam freezer di laboratorium pada suhu 5°C. Data awal sampel seperti berat, warna, dan morfologi dicatat dan didokumentasikan menggunakan kamera bawah air seperti pada Gambar 1.



Foto di udara terbuka

Foto *under water*

Gambar 1. Sampel spons kode SML-06 di udara terbuka dan di bawah air (koleksi pribadi)

Berat total basah dari spons SML-6 adalah 460 gram. Karakteristik fisik sampel adalah berwarna biru, berbentuk tabung dengan osculum yang jelas pada ujung bagian atas, elastis, dan bagian permukaan yang kasar.

### 2.3. Eksperimen

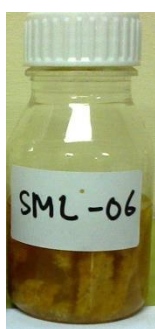
#### *Preparasi sampel dan taksonomi*

Sampel sponge dibagi dua untuk keperluan identifikasi taksonomi dan ekstraksi. Sekitar 30 g sampel direndam beberapa menit dalam metanol kemudian ditiriskan dan disimpan dalam botol

ukuran 50 mL. Kemudian diidentifikasi taksonominya berdasarkan pada spikula, kerangka, konsistensi dan morfologinya. Identifikasi dilakukan di Lembaga Oseanografi Nasional (LIPI) atau Research Center for Oceanography (RCO) LIPI Jakarta, Identifikasi taksonomi mengacu pada panduan identifikasi yang dikembangkan oleh [9].

### ***Ekstraksi skala kecil (small scale extraction)***

Ekstraksi skala kecil dilakukan untuk mendapatkan ekstrak lebih cepat untuk keperluan uji toksisitas, uji fitokimia dan analisis instrumentasi yang membutuhkan sedikit ekstrak sebagai data awal. Sekitar 50 gram sampel dipotong kecil-kecil dan selanjutnya diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol pro analyst (Gambar 2). Maserasi dilakukan berulang kali hingga diperoleh ekstrak bening. Ekstrak disaring menggunakan corong Buchner kemudian diuapkan menggunakan evaporator hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian ditimbang dan selanjutnya disimpan dalam freezer dan siap untuk uji toksisitas.



Gambar 2. *Small scale extraction* dari sampel spons SML-06

### ***Uji fitokimia***

Pada penelitian ini, uji fitokimia terhadap ekstrak metanol dilakukan hanya untuk mendeteksi kelompok metabolit sekunder steroid, terpenoid dan alkaloid. Reagen yang digunakan terdiri atas Lieberman-Burchard, Salkowski, Dragendorff, Mayer, dan Wagner.

- a. Steroid. Uji steroid menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard (LB) yang dibuat dengan mencampur asam asetat anhidrida dan kloroform dengan perbandingan 1:1 dan siap digunakan bersama asam sulfat. Ekstrak dilarutkan dalam 2 mL pereaksi LB kemudian ditetesi sekitar 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Perubahan warna menjadi ungu, biru atau hijau yang diamati mengindikasikan positif steroid [10].
- b. Terpenoid. Uji terpenoid menggunakan pereaksi Salkowsky dimana ekstrak dilarutkan dalam kloroform (CHCl<sub>3</sub>) dan ditambahkan sedikit demi sedikit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan membentuk lapisan. Warna coklat dan kemerahan yang mengindikasikan positif terpenoid [11].
- c. Alkaloid. Uji alkaloid menggunakan pereaksi Dragendorff, Mayer dan Wagner. Ekstrak sampel yang dilarutkan dalam asam klorida encer selanjutnya dibagi menjadi tiga bagian ke dalam tiga buah tabung reaksi. Tabung reaksi pertama ditambahkan pereaksi Mayer akan terbentuk warna sedikit kuning, tabung reaksi kedua ditambahkan pereaksi Dragendorff akan membentuk warna oranye keruh, dan tabung reaksi ketiga ditambahkan pereaksi Wagner akan terbentuk warna coklat keruh. Perubahan yang terjadi diamati terhadap ketiga tabung reaksi [11].

### ***Uji toksisitas***

Uji toksisitas dilakukan untuk mendeteksi efek toksik suatu senyawa terhadap fisiologi hewan untuk memperoleh data konsentrasi dan respon mematikan hewan uji selama 24 jam. Uji toksisitas

mengacu pada metode yang telah dikembangkan oleh by<sup>[12][13]</sup>yaitu Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) untuk mendeteksi tingkat toksisitas senyawa bahan alam terhadap hewawn uji shrimp larvae (*Artemia salina*). Tahapan uji meliputi pembuatan larutan induk dari ekstrak spons yang dilarutkan dalam pelarut *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO). Masing-masing sebanyak 1 mL, 0,1 mL, dan 0,01 mL larutan induk diambil untuk membuat larutan uji dengan konsentrasi masing-masing 1000µg/mL, 100 µg/mL, dan 10 µg/mL larutan uji. Setiap konsentrasi dibuat tiga kali pengulangan pada botol vial ukuran 10 mL. Masing-masing vial diisi dengan 10 ekor *Artemia salina* dan total *Artemia salina* untuk sekali pengujian dengan tiga konsentrasi adalah 90 ekor. Pengamatan jumlah kematian shrimp larvae.dilakukan setelah 24 jam. Data hasil uji toksisitas dihitung menggunakan analisis probit.

### **Analisis FTIR**

Ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi skala kecil dianalisis menggunakan instrumen *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) untuk mengidentifikasi gugus-gugus fungsi yang terdapat pada ekstrak metanol SML-06. Data FTIR yang diperoleh dihubungkan dengan temuan senyawa-senyawa pada spesies spons *Niphates olemda* dari beberapa referensi. Hasil ini merupakan data pendahuluan untuk memperkirakan kandungan kelompok metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak metanol spons *Niphates olemda*.

## **3. Hasil dan pembahasan**

### **3.1. Preparasi Sampel dan taksonomi**

Tiga bagian sampel spons kode SML-06 masing-masing untuk identifikasi taksonomi, ekstraksi skala kecil dan ekstraksi skala makro. Hasil identifikasi taksonomi yang dilakukan oleh Tri Aryono Hadi dari Lembaga Oseanografi Nasional (LON) LIPI Ancol dengan mengacu pada protokol identifikasi sponsmenunjukkan taksonomi sampel SML-06 sebagai berikut :

Kingdom : Animalia  
Filum : Porifera  
Kelas : Demospongiae  
Subkelas : Heterosleromorpha  
Ordo : Haplosclerida  
Famili : Niphatidae  
Genus : *Niphates*  
Spesies : *Niphates olemda*

Karakteristik spesies spons *Niphates olemda* dari taksonom lainnya di tempat berbeda menjelaskan bahwa *Niphates olemda* (de Laubenfelds, 1954) merupakan spons berwawarna biru, atau spons tubular merah muda dengansmall *oxeas* (92–100 × 2–3 µm)<sup>[14]</sup>. Spesimen SML-06 disimpan di Pusat Penelitian Lembaga Oseanografi Nasional (PUSLIT LON) LIPI, Ancol, Jakarta, Indonesia dan diberi kode voucher SV 05/12/13.

### **3.2. Ekstraksi skala kecil (Small scale extraction)**

Bagian kedua dari sampel yaitu untuk ekstraksi skala kecil sebanyak 23 gram sampel spons basah dengan cara maserasi beberapa kali menggunakan metanol hingga diperoleh filtrat bening, kemudian disaring dan dievaporasi hingga diperoleh berat ekstrak metanol hasil ekstraksi skala kecil yaitu 40,3 mg.Ekstraksi skala kecil dilakukan untuk mendapat data uji toksisitas dan FTIR dengan cepat sementara ekstrak untuk uji fitokimia diperoleh dari hasil ekstraksi skala makro.

### **3.3. Uji fitokimia**

Hasil uji fitokimia menunjukkan keberadaan kelompok metabolit sekunder terpenoid dan steroid (Tabel 1). Kehadiran terpenoid dalam ekstrak metanol *Niphates olemda* dapat dihubungkan dengan senyawa diterpen yaitu Niphateolide A yang diisolasi dari *Niphates olemda* asal Mantehage Sulawesi Utara. Sementara kehadiran alkaloid masih diragukan dengan hasil negatif terhadap pereaksi Mayer dan Wagner meskipun positif (+) terhadap pereaksi Dragendorff.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak metanol Spons *Niphates olemda*

Ekstrak metanol	Pereaksi dan hasil uji					Kelompok metabolit sekunder
	LB	Salkowsky	Meyer	Wagner	Dragendorff	
<i>Niphates olemda</i>	Hijau muda(++)	Merah - kecoklatan(++)	-	-	Merah bata (+)	Terpenoid, steroid dan alkaloid

Keterangan : + (terjadi perubahan warna), ++ (terbentuk suspensi), +++ (terbentuk endapan)

### 3.4. Uji toksisitas

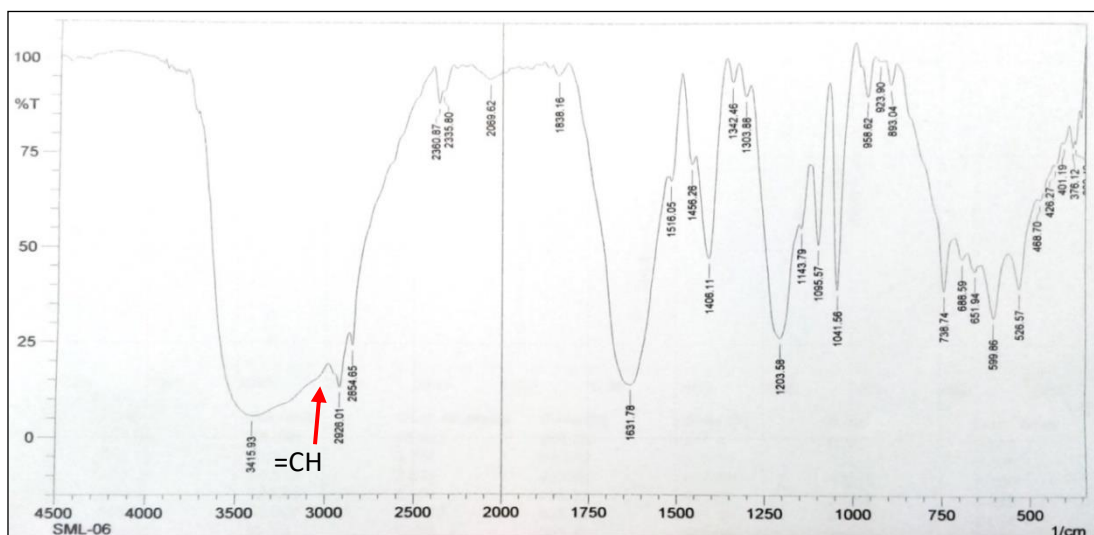
Hasil uji toksisitas pada Tabel 2 menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Niphates olemda* (SML-06) menunjukkan tingkat toksisitas yang tinggi dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 87,5 ppm dan dengan demikian maka ekstrak metanol *Niphates olemda* berpotensi dilanjutkan ke tahapan isolasi untuk mendapatkan komponen aktif sitotoksik dan ditentukan struktur molekulnya. Potensi aktivitas sitotoksik dari ekstrak tersebut ada kaitannya dengan dugaan struktur molekul yang dikandungnya seperti pada senyawa *Lunatin* dan *Niphateolide A* dimana terdapat gugus-gugus fungsi OH, C=C, C=O, =CH dan C-O yang menjadi sisi aktif yang bekerja terhadap aktivitas sebagai sitotoksik.

Tabel 2. Data hasil pengamatan kematian larva udang (*Artemia salina* Leach.) setelah 24 jam perlakuan

KodeSampel	Jumlah larva mati tiap konsentrasi			Persentase kematian larva udang (%)			% kematian larva udang - % kematian kontrol			$LC_{50}$ (ppm)
	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	10 ppm	100 ppm	1000 ppm	
SML 06	7	5	10	70	50	100	40	20	70	<b>87,5</b>
	6	8	10	60	80	100	40	80	60	
	5	10	10	50	100	100	20	80	50	
Total Kematian	18	23	30	60	77	100	33,3	60	60	
Kontrol	3	3	3	30	30	30				
	2	0	4	20	0	40				
	3	2	5	30	20	50				
Total Kematian	8	5	12	26,6	16,6	40				

### 3.4. Karakterisasi FTIR

Karakterisasi ekstrak metanol dari SML-06 menggunakan FTIR menunjukkan beberapa serapan yang muncul pada bilangan gelombang yang khas untuk gugus-gugus fungsi utama seperti regangan OH, C=O, C=C, C-O, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> dan tekukan (bending) dari CH<sub>3</sub> dan CH<sub>2</sub> sebagaimana terlihat pada Gambar 2. Detail dari serapan gugus fungsi tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar3. Spektrum FTIR ekstrak metanol spons SML-06

Tabel 2. Hasil interpretasi spektrum FTIR dari ekstrak metanol SML-6

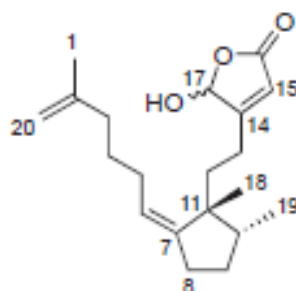
No.	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Gugus Fungsi	Niphateolide A ( $\nu$ (cm <sup>-1</sup> )) <sup>[4]</sup>
1.	3415	O-H <sub>str.</sub>	3291
2.	2926	-CH (-CH <sub>2</sub> Alifatik) <sub>str.</sub>	2930
3.	2854	-CH (-CH <sub>3</sub> Alifatik) <sub>str.</sub>	2756, 2738
4.	1631	C=C (Olefin) <sub>str.</sub>	1648
5.	1456	CH <sub>3</sub> bend	1456
6.	1406	CH <sub>2</sub> bend.	
7.	1203	C-O (alkohol, ester, Asam karboksilat) <sub>str.</sub>	1265
8.	1143	C-O (alkohol) <sub>str.</sub>	1126
9.	1095	C-O (alkohol) <sub>str.</sub>	
10.	1041	C-O (alkohol) <sub>str.</sub>	
11.	738 – 526	CH <sub>2</sub> bend.	

Keterangan : *str.* = *stretching* (regangan), *bend.* = *bending* (tekukan)

Karena yang dianalisis oleh FTIR adalah berupa ekstrak metanol maka beberapa serapan terlihat melebar yang mengindikasikan overalpping beberapa serapan regangan (*stretching*) seperti OH dengan =CH membentuk bahu (*shoulder*) yang tidak terdandai pada spektrum dan kehadirannya disupport oleh serapan regangan (*stretching*) C=C yang melebar pada 1631 cm<sup>-1</sup>. Pelebaran dan overlapping serapan ini disebabkan oleh kompleksitas komponen senyawa organik pada ekstrak metanol SML-6. Beberapa pita serapan dari senyawa Niphateolide A pada Gambar 4, memiliki kemiripan bilangan gelombang dengan beberapa serapan dari ekstrak metanol spons *Niphates olemda* dan diduga data serapan yang mirip tersebut sebagai Niphateolide A. Untuk membuktikan keberadaan senyawa



tersebut maka perlu dilakukan penelitian lanjutan yaitu solasi, permurnian dan penentuan struktur molekulnya.



Niphateolide A

Gambar 4. Struktur diterpen Niphateolide A <sup>[4]</sup>

### 3. Kesimpulan

Ekstrak Spons *Niphates olemda* termasuk dalam kategori sangat toksik dengan nilai LC50 87,5 µg/mL. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol positif mengandung terpenoid, steroid dan dugaan alkaloid. Profil FTIR dari ekstrak metanol *Niphates olemda* menunjukkan keberadaan beberapa gugus fungsi yaitu OH, C=C, =CH, C-O, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>,

### Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI) atas dukungan dana dan kesempatan. Terimakasih juga disampaikan kepada Universitas Hasanuddin dan Universitas Tanjungpura atas dukungannya.

### Daftar Pustaka

- [1] Salvatore De R., Katya S., Zornitsa K., Assia P., Carmine I., Kamen S., and Simeon P. (2006). Sterol and Lipid Composition of Three Adriatic Sea Sponges, *Z. Naturforsch.*, 61c, 129-134
- [2] Hooper, J.N.A. (2002). Sponguide: guide to sponges collection and identification, *Queensland museum*, South Brisbane.
- [3] Daloz, D. and J. C. Braekman. (1994). *Separation Methods: Application to The Isolation of Sponges Metabolites*. In: Soest, R. W. M. van, Th. M. G. van Kempen, and J. C. Braekman. (Eds.), *Sponges in Time and Space. Proc. 4<sup>th</sup> Int. Porifera Congr.* Rotterdam: Balkema
- [4] Hikaru Kato, Tatsuo Nehira, Koichi Matsuo, Tetsuro Kawabata, Yoshihiro Kobashigawa, Hiroshi Morioka, FitjeLosung, Remy E.P. Mangindaan, Nicole J. deVoogd, Hideyoshi Yokosawa, Sachiko Tsukamoto. (2015). Niphateolide A: isolation from the marine sponge *Niphates olemda* and determination of its absolute configuration by an ECD analysis, *Tetrahedron* 71 (2015) 6956-6960
- [5] Suciati, Karma Rabgay, Yunda Fachrunniza, Tongchai Saesong, Tri Aryono Hadi, Tutik Sri Wahyuni, Aty Widyawar Uyanti, and Kornkanok Ingkaninan. (2019). Enzyme Inhibitory Activities of Marine Sponges Against Cholinesterase and 5 $\alpha$ -Reductase, *Malays. Appl. Biol.* (2019) 48(3): 77-83
- [6] Raquel Jadulco, Gernot Brauers, Ru Angelie Edrada, Rainer Ebel, Victor Wray, Sudarsono, and Peter Proksch. (2002). New Metabolites from Sponge-Derived Fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*, *J. Nat. Prod.* 65, 730-733.

- [7] Tresa Remya A. Thomas, Devanand P. Kavlekar and Ponnappakkam A. Loka Bharathi. (2010). Marine Drugs from Sponge-Microbe Association—A Review, *Mar. Drugs*, 8, 1417-1468; doi:10.3390/md8041417
- [8] Jean-Claude Braekman, Desire Daloze, Catherine Stoller and Rob W. M. Van Soest. (1992). Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera: Demospongiae) *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 20. No. 5, pp, 417-431.
- [9] John N.A. Hooper<sup>1</sup> and Rob W.M. Van Soest. (2002). Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges, *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*, Edited by John N.A. Hooper and Rob W.M. Van Soest. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- [10] Rahman Gul, Syed Umer Jan, Syed Faridullah, Samiullah Sherani, and Nusrat Jahan. (2017). Preliminary Phytochemical Screening, Quantitative Analysis of Alkaloids, and Antioxidant Activity of Crude Plant Extracts from *Ephedra intermedia* Indigenous to Balochistan, Hindawi, *Scientific World Journal* Volume 2017, Article ID 5873648, 7 pages. doi.org/10.1155/2017/5873648
- [11] Solihah, M.A., Wan Rosli, W.I. and Nurhanan, A.R. (2012). Phytochemicals screening and total phenolic content of Malaysian *Zea mays* hair extracts, *International Food Research Journal* 19(4): 1533-1538
- [12] Meyer B. N., Ferrigni N. R., Putnam J. E., Jacobsen L. B., Nichols D. E., and McLaughlin J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for the active plant constituents. *Planta Medica*, 45:31-34.
- [13] McLaughlin, J.L, Rogers, L.L. (1998). *The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals*, *Drug Information Journal*, 32: 513-524.
- [14] Barbara Calcinaï, Azzurra Bastari, Giorgio Bavestrello, Marco Bertolino, Santiago Bueno Horcajadas, Maurizio Pansini, Daisy M. Makapedua, Carlo Cerrano. (2017). Demosponge diversity from North Sulawesi, with the description of six new species, *ZooKeys* 680: 105-150