

KAJIAN PENDAHULUAN POTENSI ANTI KANKER DENGAN UJI TOKSISITAS METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT) TERHADAP EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI-FRAKSI DARI KULIT BATANG KEMIRI *Aleurites moluccana* (L.) Willd.

Ari Sri Windyaswari, Fahrauk Faramayuda, Dessy Ratnasari
Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani
windyaswari84@gmail.com

ABSTRAK

Pohon kemiri *Aleurites moluccana* (L.) Willd., adalah tanaman asli Indonesia multiguna, tumbuh menyebar hingga 10-15 meter pada area terbuka di dataran Indonesia Malaysia dan kepulauan Pasifik. Penelitian sebelumnya menunjukkan tanaman kemiri mengandung tanin, saponin, flavonoida dan polifenol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi anti kanker melalui pengujian toksisitas ekstrak etanol kulit batang kemiri *Aleurites moluccana* (L.) Willd. dengan metode BSLT menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina*. Pengukuran toksisitas dinyatakan dengan nilai LC_{50} . Pembuatan ekstrak dilakukan dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol. Hasil pengujian toksisitas ditunjukkan dengan nilai LC_{50} dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksana, dan fraksi air. Nilai toksisitas yang paling kuat hingga paling lemah adalah fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan, ekstrak etanol, fraksi air secara berturut-turut adalah 17,10 ppm; 35,74 ppm; 39,29 ppm; dan 378,532 ppm. Intensitas nilai LC_{50} hasil pengujian BSLT dari fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan, ekstrak etanol dan fraksi air berturut-turut adalah sangat toksik, sangat toksik, sangat toksik, dan toksik. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan penampak bercak spesifik menunjukkan dugaan golongan flavonoid pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat pada kulit batang kemiri.

Kata kunci : BSLT, kulit batang kemiri, *Aleurites moluccana* (L.) Willd., flavonoid.

ABSTRACT

Aleurites moluccana (L.) Willd., also known as candlenut, is a native to Indonesia great domesticated multipurpose trees, typically grows to 10-15 m in open areas, It is native to the Indo-Malaysia region and was introduced throughout the Pacific Island. Previous studies have demonstrated that the leaves and stem bark of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. presents tannins, saponin, flavonoid, and polyphenols. The aim of this research was to determine the toxicity value using BSLT method as screening for new potential cytotoxic drug. This research was started with maceration technique using ethanol solvent. The research was started with maceration method using ethanol solvent. Determination of toxicity value of *Aleurites molucana* (L.) Willd. stem bark were examined using BSLT method. The toxicity value for extract and each fractions was reported as medial lethal concentration (LC_{50}) value, expressed in ppm. The LC_{50} value using BSLT method of ethyl acetate fraction, *n*-hexane fraction, ethanol extract, water fraction were 17,10 ppm; 35,74 ppm; 39,39 ppm; 380,93 ppm respectively. While intensity of LC_{50} value for toxicity value of ethyl acetate fraction, *n*-hexane fraction, ethanol extract, water fraction were very toxic, very toxic, very toxic, and toxic. Chromatogram pattern were observed by Thin Layer Chromatography (TLC) with specific spray agent, detected the flavonoid in ethanol extract and ethyl acetate fraction from stem bark of *Aleurites moluccana* (L.) Willd.

Key words : BSLT, stem bark of candlenut, *Aleurites moluccana* (L.) Willd., flavonoid.

PENDAHULUAN

Aleurites moluccana (L.) Willd tersebar luas di kepulauan Indonesia hingga Asia

Tenggara, daerah tropis benua Amerika hingga kepulauan Virgin. Tanaman kemiri merupakan tanaman yang memiliki banyak kegunaan pada hampir seluruh bagian tanaman. Di Indonesia, penggunaan empiris kulit batang kemiri untuk pengobatan disentri, laksatif, antidiare, dan sariawan. Di Jepang, kulit batang kemiri digunakan sebagai anti tumor (Scott, dkk., 2000)

Penelitian Gani dkk tahun 2001 menunjukkan bahwa kulit batang kemiri mengandung metabolit sekunder yang bertanggungjawab dalam aktivitas antikanker, yaitu tanin, saponin, flavonoida dan polifenol. Penelitian pendahuluan mengenai aktivitas antikanker dari kulit batang kemiri belum pernah dilakukan, sehingga perlu dilakukan penelitian awal mengenai uji aktivitas anti kanker dari kulit batang kemiri dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT).

Brine Shrimp Lethality Test adalah metode awal yang sering dipakai untuk mengamati toksisitas senyawa. Metode BSLT mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat. Penggunaan BSLT sebagai *bioassay* pertama kali dilaporkan oleh Tarpley untuk menentukan beberapa residu insektisida, menentukan senyawa anestetik, serta menentukan tingkat toksisitas air laut. Selanjutnya, Meyer dkk, pada tahun 1982 menggunakan BSLT dalam penapisan senyawa-senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak tanaman yang ditunjukkan sebagai toksisitas terhadap larva *Artemia Salina* Leach.

METODE

Penelitian yang dilakukan meliputi preparasi simplisia, teknik ekstraksi dan fraksinasi, uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), serta pembuatan profil dan identifikasi kandungan metabolit sekunder dengan metode Kromatografi Lapis Tipis dari fraksi dan atau ekstrak yang memberikan aktivitas toksik paling tinggi.

Preparasi Simplisia. Kulit batang kemiri diambil dari perkebunan Manoko, Lembang, Indonesia, kemudian dilakukan sortasi basah,

pengeringan dan sortasi kering. Proses pengeringan simplisia dilakukan selama 7 hari pada suhu 40°C.

Teknik Ekstraksi dan Fraksinasi. Sebanyak 500 gram serbuk simplisia diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol selama 24 jam. Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali hingga didapatkan filtrat bening. Filtrat bening diuapkan diatas rotavapor hingga didapatkan ekstrak kental etanol (A).

Fraksinasi dari ekstrak etanol dilakukan dengan metode Ekstraksi Cair-Cair (ECC) menggunakan gradien pelarut dengan kepolaran meningkat, yaitu pelarut *n*-heksana, etil asetat dan air, sehingga akan didapat tiga fraksi yaitu fraksi *n*-heksan (B), fraksi etil asetat (C) dan fraksi air (D).

Pengujian Toksisitas Metode BSLT

Penyiapan larva uji *Artemia salina*. Pembiakan telur *Artemia salina* dilakukan dalam wadah akuarium berisi air laut yang terdiri dari dua bagian yang berhubungan yaitu bagian terang yang disinari lampu dan bagian gelap yang ditutup dengan *aluminium foil*. Telur *Artemia salina* yang akan ditetaskan, terlebih dahulu direndam dalam air suling selama ± 1 jam, kemudian telur yang mengapung dibuang dan yang mengendap dimasukkan ke dalam tempat penetasan diletakkan pada bagian gelap bejana untuk ditetaskan, setelah kira-kira 24 jam nauplii yang telah menetas akan berenang menuju tempat yang terang. Nauplii yang digunakan untuk uji adalah yang berumur 48 jam setelah menetas.

Pengujian toksisitas. Ekstrak dan fraksi uji yang telah berisi larva udang *Artemia salina* Leach dengan berbagai variasi konsentrasi, didiamkan terlebih dahulu selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva udang yang mati dari tiap vial. Uji toksisitas dengan metode BSLT untuk setiap konsentrasi diulang sebanyak 3 kali pengulangan. Apabila variasi konsentrasi diatas memiliki hasil angka kematian belum mencapai 50%, maka dilakukan pengulangan pengujian dengan variasi konsentrasi yang diperbesar.

Analisa data probit. Analisis Probit dilakukan menggunakan perangkat lunak statistik SPSS.

Profil dan identifikasi metabolit sekunder dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Ekstrak dan fraksi yang memiliki nilai LC_{50} sangat kecil (sangat toksik) akan diidentifikasi kandungan metabolit sekundernya yang diduga bertanggung jawab atas aktivitas toksik pada larva udang *Artemia salina*, menggunakan plat KLT, fasa diam plat silika gel GF₂₅₄ dan untuk fase gerak menggunakan komposisi pelarut *n*-heksan : etil asetat (2:3).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian Prabowo, dkk tahun 2013 menyatakan bahwa kulit batang kemiri memiliki potensi pengembangan obat bahan alam, karena kandungan metabolit sekunder dari kulit batang kemiri memiliki banyak aktivitas farmakologis. Salah satu golongan metabolit sekunder yang dapat memberikan aktivitas toksisitas adalah flavonoid yang terdeteksi pada ekstrak etanol dan seluruh fraksi kulit batang kemiri.

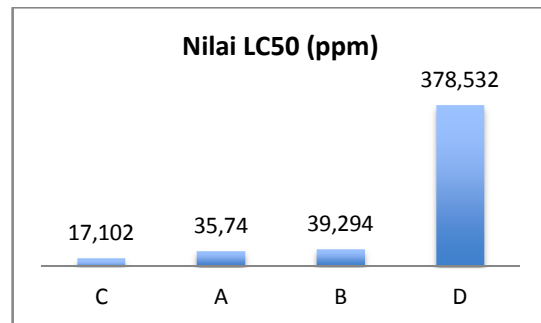
Flavonoid bersifat toksik pada saluran cerna dan dapat bertindak sebagai racun perut. Apabila flavonoid masuk kedalam tubuh larva, maka akan mengganggu sistem pencernaan larva melalui mekanisme penghambatan reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga larva tidak mampu mengenali makanan dan kehilangan nutrisi untuk tubuhnya (Nurhayati, 2006).

Pada pengujian toksisitas, semua sampel akan diuji menggunakan metode BSLT dengan hewan uji larva udang *Artemia salina*.

Pengujian toksisitas metode BSLT. Pengujian BSLT pada ekstrak dan fraksi uji dari simplisia kulit batang kemiri menggunakan beberapa konsentrasi berbeda. Nilai toksisitas dinyatakan dengan nilai LC_{50} , suatu nilai yang menyatakan sejumlah konsentrasi yang diperlukan untuk

membunuh 50% populasi larva udang *Artemia salina*.

Penelitian Meyer, dkk tahun 1982 menyatakan bahwa suatu sampel dinyatakan toksik apabila memiliki nilai LC_{50} dibawah 1000 ppm. Hasil pengujian pada ekstrak etanol (A) dengan variasi konsentrasi 8, 20, 40, 80, 120, dan 200 ppm, maka didapat nilai LC_{50} sebesar 39,294 ppm. Pada fraksi *n*-heksan dengan variasi konsentrasi 20, 40, 60, 80, 120, dan 200 ppm, didapat nilai LC_{50} 35,740 ppm. Pada fraksi etil asetat (C) dengan variasi konsentrasi 10, 20, 40, 80, 120, dan 200 ppm didapat nilai LC_{50} 17,102 ppm. Sedangkan pada fraksi air dengan variasi konsentrasi 200, 400, 600, 800, 1000, dan 1200 didapat nilai LC_{50} sebesar 380,932 ppm.



Gambar 1. Pengujian toksisitas metode BSLT, dinyatakan dengan nilai LC_{50} (ppm), ekstrak etanol (A), fraksi *n*-heksan (B), fraksi etil asetat (C), fraksi air (D).

Dari hasil diatas dapat disimpulkan bahwa ekstrak dan fraksi dari kulit batang kemiri menunjukkan aktivitas toksik karena memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm. Akan tetapi, fraksi etil asetat (C) menunjukkan aktivitas yang sangat toksik, diikuti dengan fraksi *n*-heksan (B) sangat toksik, ekstrak etanol (A) sangat toksik dan fraksi air (D) toksik.

Analisis Probit Data hasil pengujian toksisitas diinterpretasikan secara statistik. Analisis probit umumnya digunakan dalam toksikologi untuk menentukan toksisitas relatif bahan kimia untuk organisme hidup. Hal ini dilakukan dengan menguji respon berbagai organisme di bawah konsentrasi dari masing-masing bahan kimia. Setelah regresi dilakukan, selanjutnya menggunakan luaran dari analisis probit untuk

membandingkan konsentrasi yang diperlukan untuk mendapatkan respon yang sama di berbagai jenis sampel, dimana titik akhir digunakan untuk membandingkan perbedaan toksisitas bahan kimia, dimana nilai toksisitas tersebut dinyatakan dalam bentuk LC_{50} atau LD_{50} .

Estimasi probit pada ekstrak etanol (A) kulit batang kemiri menyatakan aktivitas toksisitas LC_{50} pada probit 0.5 adalah 39,294 ppm, yang bermakna dengan tingkat keyakinan 95%, pada konsentrasi (A) sebesar 39,294 ppm memiliki aktivitas toksik untuk membunuh sebanyak 50% dari keseluruhan populasi larva udang.

Tabel 1. Hasil analisis statistik probit pada sampel ekstrak etanol (A) kulit batang kemiri *Aleurites moluccana* (L.) Willd.

Probability	95% Confidence Limit for Concentration	
	Estimate	
0.01	1,135	
0.02	1,719	
0.03	2,237	
0.04	2,728	
0.05	3,205	
0.06	3,677	
0.07	4,147	
0.08	4,619	
0.09	5,094	
0.1	5,575	
0.15	8,100	
0.2	10,899	
0.25	14,060	
0.3	17,673	
0.35	21,845	
0.4	26,710	
0.45	32,447	
Probit 0.5	39,294	
0.55	47,587	
0.6	57,807	
0.65	70,682	
0.7	87,367	
0.75	109,816	
0.8	141,665	
0.85	190,624	
0.9	276,937	
0.91	303,081	
0.92	334,287	
0.93	372,320	
0.94	419,935	
0.95	481,717	
0.96	566,011	
0.97	690,116	
0.98	898,200	
0.99	1360,700	

Estimasi probit pada fraksi n-heksan (B) kulit batang kemiri menyatakan aktivitas toksisitas LC_{50} pada probit 0.5 adalah 35,740 ppm, yang bermakna dengan tingkat

keyakinan 95%, pada konsentrasi (A) sebesar 35,740 ppm memiliki aktivitas toksik untuk membunuh sebanyak 50% dari keseluruhan populasi larva udang.

Tabel 2. Hasil analisis statistik probit pada sampel fraksi n-heksana (B) kulit batang kemiri *Aleurites moluccana* (L.) Willd.

Probability	95% Confidence Limit for Concentration	
	Estimate	
0.01	3,863	
0.02	5,013	
0.03	5,915	
0.04	6,669	
0.05	7,413	
0.06	8,080	
0.07	8,713	
0.08	9,323	
0.09	9,915	
0.1	10,492	
0.15	13,264	
0.2	15,980	
0.25	18,750	
0.3	21,644	
0.35	24,724	
0.4	28,050	
0.45	31,693	
Probit 0.5	35,740	
0.55	40,340	
0.6	45,539	
0.65	51,665	
0.7	59,015	
0.75	68,124	
0.8	79,931	
0.85	96,301	
0.9	121,741	
0.91	128,833	
0.92	137,007	
0.93	145,594	
0.94	158,096	
0.95	172,319	
0.96	190,674	
0.97	215,939	
0.98	254,781	
0.99	330,666	

Estimasi probit pada fraksi etil asetat (C) kulit batang kemiri menyatakan aktivitas toksisitas LC_{50} pada probit 0.5 adalah 17,102 ppm, yang bermakna dengan tingkat keyakinan 95%, pada konsentrasi (C) sebesar 17,102 ppm memiliki aktivitas toksik untuk membunuh sebanyak 50% dari keseluruhan populasi larva udang.

Tabel 3. Hasil analisis statistik probit pada sampel fraksi etil asetat (C) kulit batang kemiri *Aleurites moluccana* (L.) Willd.

Probability	95% Confidence Limit for Concentration	
	Estimate	
0.01	0,235	
0.02	0,389	
0.03	0,535	
0.04	0,679	
0.05	0,826	
0.06	0,975	
0.07	1,128	
0.08	1,284	
0.09	1,446	
0.1	1,613	
0.15	2,533	
0.2	3,627	
0.25	4,935	
0.3	6,508	
0.35	8,409	
0.4	10,723	
0.45	13,568	
0.5	17,102	
0.55	21,558	
0.6	27,276	
0.65	34,785	
0.7	44,946	
0.75	59,264	
0.8	80,636	
0.85	115,457	
0.9	181,370	
0.91	202,275	
0.92	227,724	
0.93	259,417	
0.94	300,055	
0.95	354,229	
0.96	430,499	
0.97	547,123	
0.98	752,463	
0.99	1243,430	

Estimasi probit pada fraksi air (D) kulit batang kemiri menyatakan aktivitas toksisitas LC_{50} pada probit 0.5 adalah 378,532 ppm, yang bermakna dengan tingkat keyakinan 95%, pada konsentrasi (D) sebesar 378,532 ppm memiliki aktivitas toksik untuk membunuh sebanyak 50% dari keseluruhan populasi larva udang.

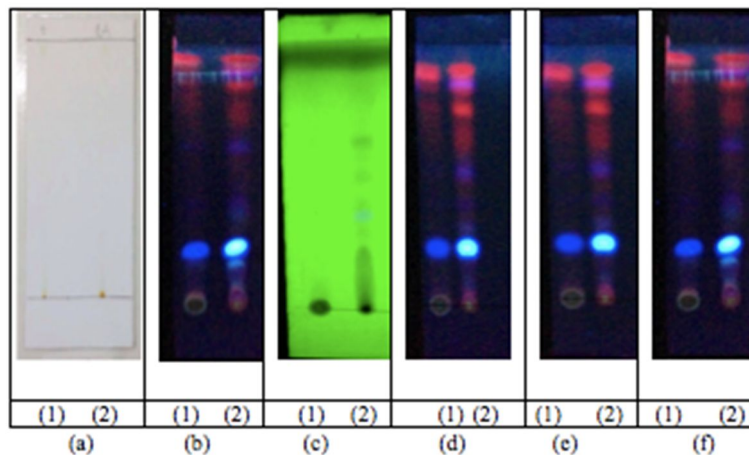
Tabel 4. Hasil analisis statistik probit pada sampel fraksi air (D) kulit batang kemiri *Aleurites moluccana* (L.) Willd.

Probability	95% Confidence Limit for Concentration	
	Estimate	
0.01	31,471	
0.02	42,119	
0.03	50,675	
0.04	58,238	
0.05	65,215	
0.06	71,808	
0.07	78,135	
0.08	84,272	
0.09	90,271	
0.1	96,169	
0.15	124,984	
0.2	153,926	
0.25	184,041	
0.3	216,076	
0.35	250,718	
0.4	288,713	
0.45	330,944	
0.5	378,532	
0.55	432,964	
0.6	496,295	
0.65	571,504	
0.7	663,130	
0.75	778,557	
0.8	930,882	
0.85	1146,443	
0.9	1489,939	
0.91	1587,299	
0.92	1700,290	
0.93	1833,835	
0.94	1995,421	
0.95	2197,159	
0.96	2460,384	
0.97	2827,587	
0.98	3401,925	
0.99	4553,038	

Profil dan Identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. Profil dan identifikasi senyawa metabolit sekunder hanya dilakukan terhadap sampel uji yang memberikan aktivitas toksik yang sangat kuat dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Profil kromatografi yang diperoleh pada fraksi etil asetat (C) memberikan fluoresensi berwarna biru (kuat), dan fluoresensi biru (lemah) pada ekstrak etanol (A) di bawah sinar UV 365 nm dengan masing-masing nilai R_f 0,23. Hal ini menunjukkan identifikasi awal untuk golongan flavonoid adalah positif. Selanjutnya, digunakan tahap identifikasi lanjutan untuk golongan flavonoid yaitu penggunaan uap NH_3 , yang memberikan fluoresensi berwarna biru terang (kuat) di bawah sinar UV 365 nm dengan nilai R_f pada fraksi etil asetat (C) dan ekstrak etanol (A) berturut-turut sebesar 0,24 dan 0,24.

Penampak bercak spesifik untuk golongan flavonoid adalah sitroborat, dapat digunakan untuk identifikasi lanjutan. Hasil yang di peroleh setelah disemprot dengan penampak bercak sitroborat fraksi etil asetat (C) dan ekstrak etanol (A) dan menunjukkan adanya fluoresensi berwarna biru terang (kuat) di bawah sinar UV 365 nm dengan masing-

masing nilai Rf sebesar 0,24. Tahap akhir untuk identifikasi golongan flavonoid adalah menggunakan penampak bercak spesifik yaitu $AlCl_3$, yang memberikan hasil fluoresensi biru (kuat) dibawah sinar UV 365 nm pada fraksi etil asetat (C) dan ekstrak etanol (A) dengan masing-masing nilai Rf sebesar 0,24.



Gambar 2. Profil kromatogram lapis tipis ekstrak etanol dan fraksi etil asetat kulit batang *Aleurites moluccana* (L.) Willd., fase diam silika gel GF₂₅₄, fasa gerak n-heksana : etil asetat (3:2), (1) fraksi etil asetat, (2) ekstrak etanol, (a) visual, Rf 0,23, (b) sinar UV 365 nm, Rf 0,24, (c) penampak bercak sitroborat dibawah sinar UV 365 nm, Rf 0,24, (d) penampak bercak $AlCl_3$ dibawah sinar UV 365 nm, Rf 0,24.

Hasil dari identifikasi tersebut dapat digunakan untuk menyusun profil KLT yang menunjukkan adanya golongan flavonoid yang terdapat pada fraksi etil asetat (C) dan ekstrak etanol kulit batang kemiri (A)

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap kulit batang kemiri dapat disimpulkan bahwa nilai LC₅₀ yang di peroleh dari ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi n-heksan secara berturut-turut adalah 39,294 $\mu\text{g/mL}$, 380,932 $\mu\text{g/mL}$, 17,102 $\mu\text{g/mL}$, dan 35,74 $\mu\text{g/mL}$. Dimana yang memberikan aktivitas toksik paling kuat pada kulit batang kemiri adalah fraksi etil asetat dengan LC₅₀ sebesar 17,102 $\mu\text{g/mL}$. Dan berdasarkan hasil KLT, senyawa yang diduga memiliki aktivitas toksik pada fraksi

etil asetat kulit batang kemiri adalah flavonoid.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Fakultas Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani atas fasilitas dan kesempatan yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Rahim, A., Alam, G., Agustina, R., Rusydi, M. 2012. Skrining Toksisitas Ekstrak Herba Bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test. Majalah Farmasi dan Farmakologi, Vol.16, No.2. Hlm 99-106.
- Agoes, G., 2007, *Teknologi Bahan Alam*, Penerbit ITB, Bandung: 2-3, 21-23.

- Azidin, Y.H. 1990, *Pengobatan Tradisional Daerah Kalimantan Selatan Departemen P&K Direktorat Jenderal Kebudayaan, Direktorat Sejarah dan Nilai Tradisional, Proyek Inventarisasi dan Pembinaan Nilai-nilai Budaya*. Jakarta:1-3
- Colegate, S.M. and Molyneux, R.J., 1993, *Bioactive Natural Product, Detection, Isolation, and Structural Determination*, CRC Press., Boca Raton USA: 442, 444-448.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008, *Farmakope Herbal Indonesia*, Edisi 1, Jakarta: 162-175.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta; Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. 26.
- Fransworth., N.R., (1996), *Biological and Phytochemical Screening of Plants*, J. Pharm.Sci, 55(3) : 243-269.
- Gali-Muhtasib, H. U., Younes, I. H., Karchesy,J.J., El-Sabban, Marwan E., 2001, *Plant Tannins Inhibit the Induction of Abberant Crypt Foci and Colonic Tumors by 1,2-Dimethylhydrazine in Mice*
- Harborne, J.B., 1996, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Terbitan kedua, Penerbit ITB, Bandung: 6-9,14-15, 19-22, 24,25.
- Harini, M., Zuhud, Sangat E.A.M., Damayanti, Ellyn K., 2000, *Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia (Etnofitomedika I)*, Yayasan Obor Indonesia, Jakarta, 115, 172.
- Harmita, dan Maksum Radji. 2008. *Buku Ajar Analisis Hayati Edisi 3*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hlm 76-77.
- Hutapea, J.R. dan Syamsuhidayat S.S., 1994, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Edisi II, Departemen Kesehatan RI, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.
- Johnson, E.L. dan Stevenson, R., 1991, *Dasar Kromatografi Cair*, Penerbit ITB, Bandung: 46
- Krisnawati H., Kallio M., Kanninen M., *Aleurites moluccana* (L.) Willd. Ecology, silviculture and productivity, CIFOR, Bogor, Indonesia, 3-11, 2011.
- Martawijaya, A., Kartasujana, I., Mandang, Y.I., Prawira S.A. dan Kadir, K., 1989, *Atlas Kayu Indonesia*, Jilid II, Badan Penelitian dan Pengembangan Hutan, Bogor: 59-64.
- McLaughlin, J.L., 1990, *Workshop on Brine Shrimp and Potato Disc Bioassay*, Universitas Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung: 3-6.
- Meyer, H.N., 1982, *Bhrine Shrimp Letality Test: Med. Plant Reseachr*, Vol. 45, Hipokrates Verlag Gmbrl, Amsterdam: 31-34.
- Nurhayati, A.P.D., 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker, *Jurnal*, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh November : 41-46
- Pasaribu, Subur P., Eva M., dan Bobby S.N. 2008.
- Prabowo, W., Wirasutisna K.R., Insanu, M., 2013, *Isolation and characterization of 3-acetyl aleuritolic acid and scopoletin from stem bark of Aleurites moluccana (L.) Willd*, Vol 5, Issue 3, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 1-2, ISSN : 0075-1491
- Sudjadi, 1986, *Metode Pemisahan*, UGM Press, Yogyakarta.