

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN CENGKEH
(*Syzygium Aromaticum*) TERHADAP LARVA ARTEMIA SALINA L.
DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)**

Adhistry Kharisma Justicia*, Riris Sagita Ardianti
Akademi Farmasi Yarsi Pontianak
Email : adhistry.kharisma@gmail.com

ABSTRAK

Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) merupakan salah satu tanaman rempah yang terdapat di Pulau Lemukutan, Bengkayang Kalimantan Barat. Daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) termasuk kedalam suku *Myrtaceae* yang mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid dan saponin yang berpotensi toksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) memiliki sifat toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dan mengetahui nilai LC_{50} nya. Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah Larva *Artemia Salina* Leach dengan menggunakan metode BSLT. Pengujian dilakukan dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 1000 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ dan 0 $\mu\text{g/mL}$ yang masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor larva dengan replikasi 5 kali dan waktu pengamatan selama 1x24 jam. Hasil yang didapatkan kemudian dianalisis dengan metode probit menggunakan *Ms.Excel*. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) memiliki efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dan Nilai LC_{50} yang didapatkan yaitu sebesar 71,9448 $\mu\text{g/ml}$.

Kata kunci : Daun cengkeh, Larva *Artemia salina* Leach, Metode BSLT.

ABSTRACT

Clove (*Syzygium aromaticum*) is a spice plant found on Lemukutan Island, Bengkayang, West Kalimantan. Clove leaves (*Syzygium aromaticum*) belong to the *Myrtaceae* tribe which contains secondary metabolites, namely flavonoids and saponins, which are potentially toxic. This study aims to determine whether the ethanol extract of clove leaves (*Syzygium aromaticum*) has toxic properties against *Artemia salina* Leach larvae and to know its value. Test animals used in this study were *Artemia Salina* Leach Larvae using BSLT method. Tests were carried out with different concentrations of 1000 $\mu\text{g/mL}$, 750 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ and 0 $\mu\text{g/mL}$, each group consisting of 10 larvae tails with replication 5 times and 1x24 hour observation time. The results obtained were then analyzed using the probit method using *Ms. Excel*. The results showed that clove leaves (*Syzygium aromaticum*) had toxic effects on *Artemia salina* Leach larvae and the LC_{50} value obtained was 71.9448 $\mu\text{g/ml}$.

Keyword: Clove Leaves, *Artemia salina* Leach Larvae, BSLT Method.

PENDAHULUAN

Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) merupakan tanaman rempah yang sejak lama digunakan dalam industri makanan, minuman dan obat-obatan. Bagian tanaman cengkeh mulai dari akar, batang, daun sampai kepada bunga mengandung minyak atsiri (Ketaren S dkk, 1985). Bagian tanaman pada cengkeh yang dapat dimanfaatkan sebagai obat-obatan selain pada bunga dan tangkainya adalah daunnya. Menurut Mardisiwoyo dkk (1987), menyatakan bahwa daun cengkeh sering digunakan dalam mengatasi berbagai penyakit seperti batuk, sakit perut dan sakit gigi. Selain itu, minyak atsiri pada cengkeh juga sering digunakan untuk mengobati infeksi pada kulit. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Lambiju dkk (2017) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun cengkeh memiliki aktivitas daya hambat yang tergolong sedang terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Talahatu dkk (2015), menyatakan bahwa ekstrak daun cengkeh mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, saponin dan tanin. Nuralifah (2018), menyatakan bahwa mekanisme kematian larva *Artemia salina* L. berhubungan dengan fungsi senyawa flavonoid dan saponin yang menghambat daya makan larva (antifedant). Cara kerja flavonoid adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau sebagai racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa ini masuk kedalam tubuh larva, pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga larva mati kelaparan, sedangkan senyawa golongan saponin dapat mengikat oksigen yang terdapat didalam air sehingga kadar oksigen didalam air menurun dan larva *Artemia salina* L dapat mengalami kematian karena kekurangan oksigen.

Menurut Kunsah dan Astuti (2019) uji toksisitas akut merupakan salah satu uji praklinik. Berdasarkan *environmental potency agency*, uji toksisitas akut dilakukan untuk mengukur derajat efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat, yaitu 24-96 jam. Tolak ukur kuantitatif yang paling sering digunakan adalah LC_{50} , yaitu dosis yang membunuh 50% dari populasi spesies tertentu. Nilai LC_{50} dapat digunakan untuk menentukan tingkat efek toksik suatu senyawa sehingga dapat juga untuk memprediksi potensinya sebagai antikanker. Apabila nilai LC_{50} dengan metode BSLT pada ekstrak tanaman bersifat toksik dapat dikembangkan sebagai obat antikanker (Carballo, 2002).

Untuk mengetahui suatu tanaman memiliki potensi sebagai antikanker, maka perlu dilakukan penelitian awal. Salah satu metode awal untuk uji toksisitas adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman serta merupakan skrining awal sebagai obat

antikanker. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam.

Pengujian toksisitas akut dapat dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva *Artemia salina* Leach. Prosedurnya dengan menentukan nilai LC_{50} dari aktivitas komponen aktif tanaman terhadap larva *Artemia salina* Leach. Suatu ekstrak dikatakan toksik berdasarkan metode BSLT jika harga $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$ (ppm) (Carballo, dalam Cahyadi, R, 2009). Kematian hewan uji digunakan untuk memperkirakan dosis kematian jika digunakan manusia (Priyanto, 2009). Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah berapakah nilai LC_{50} ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap larva *Artemia salina* Leach yang diuji dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui nilai LC_{50} ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

METODE PENELITIAN

Alat.

Batang pengaduk, *termometer*, gelas ukur (*Pyrex*), blender (*Phillips*), labu takar (*Pyrex*), corong, pH universal, *aluminium foil*, toples kaca, timbangan, gelas beker (*Pyrex*), neraca analitik, pipet tetes, kertas saring, kertas label, pisau, vial, lakban hitam, wadah kaca transparan, lampu pijar 40 watt, kaca pembesar, *dry cabinet*.

Bahan.

Daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*), aquadest, etanol 96%, natrium klorida (NaCl), magnesium sulfat (MgSO_4), magnesium klorida (MgCl_2), kalium klorida (KCl), kalsium klorida (CaCl_2), natrium hidrokarbonat (NaHCO_3), telur udang *Artemia salina* Leach. Sampel yang digunakan adalah daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) yang diperoleh di Desa Kepulauan Lemukutan, Kabupaten Bengkayang, Kalimantan Barat.

Pembuatan ekstrak.

Daun cengkeh yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan dari kotoran yang menempel, lalu daun cengkeh ditimbang sebanyak 5 kg dan dicuci dengan air bersih yang mengalir. Daun cengkeh kemudian dirajang dan dikeringkan didalam *dry cabinet* pada suhu 40°C selama 3 hari. Daun cengkeh yang telah kering kemudian dibersihkan kembali dari sisa kotoran yang masih menempel, setelah itu dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk.

Sebanyak 500 gram serbuk daun cengkeh ditimbang kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 2 liter selama 3 x 24 jam. Setelah 3 x 24 jam hasil maserasi kemudian disaring dan ditampung kedalam wadah. Hasil filtrat dievaporasi dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental.

Pembuatan Air Laut Buatan.

Dibuat 1 liter air laut buatan dengan cara mencampurkan NaCl sebanyak 5 gram; kalium klorida (KCl) sebanyak 0,2 gram; magnesium sulfat (MgSO₄) sebanyak 1,3 gram; magnesium klorida (MgCl₂) sebanyak 1 gram; kalsium klorida (CaCl₂) sebanyak 0,3 gram; dan natrium hidrokarbonat (NaHCO₃) sebanyak 2 gram yang terlebih dahulu ditimbang menggunakan timbangan analitik kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 1 liter. Khusus untuk MgSO₄ sebelumnya telah dilarutkan terlebih dahulu dengan air panas (Mudjiman, 1989).

Penetasan Telur *Artemia salina* Leach.

Telur udang ditetaskan sekitar 36-48 jam sebelum dilakukan pengujian toksisitas, wadah yang berbentuk kerucut yang bening atau transparan digunakan untuk penetasan telur udang kemudian ditambahkan air laut buatan yang telah diukur pH-nya (8-9), wadah tersebut diberi penerangan dengan cahaya lampu 40 Watt untuk menghangatkan suhu dalam penetasan agar suhu penetasan 25°C-31°C tetap terjaga dan merangsang proses penetasan dengan menggunakan aerator. Telur *Artemia salina* L sebanyak 50-150 mg dicuci terlebih dahulu, yakni ditaburkan dan direndam pada wadah berisi aquades selama 1 jam, setelah itu pada wadah berisi air laut buatan 500 ml, lalu dinyalakan aerator. Telur *Artemia salina* L dibiarkan selama 36-48 jam sampai menetas menjadi *nauplii* yang matang dan siap digunakan dalam percobaan. Telur akan menetas dalam waktu 18-48 jam dan akan bergerak secara alamiah menuju daerah terang sehingga larva udang terpisah dari kulit telur. Larva yang sehat bersifat fototropik dan siap dijadikan hewan uji pada umur 36-48 jam. Larva dipisahkan dari telurnya dengan pipet ke dalam vial yang berisi air laut buatan (Harmita dan Radji, 2008).

Pembuatan Larutan Konsentrasi Sampel Uji.

Dibuat larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL sebanyak 100 mL dengan cara melarutkan 100 mg ekstrak kental daun cengkeh kedalam 100 ml air laut buatan. Setelah itu dibuat dengan seri kadar 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL dan 100 µg/mL sebanyak 5 ml dengan cara mengambil masing-masing 5 ml, 3,75 ml, 2,5 ml, 1,25 ml dan 0,5 ml larutan induk kemudian diencerkan kedalam 5 ml air laut buatan.

Pengujian Toksisitas Dengan Metode BSLT.

Pada uji toksisitas metode BSLT digunakan larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam yang dibagi menjadi 6 kelompok yang masing-masing terdiri dari 10 ekor larva dengan replikasi atau pengulangan sebanyak 5 kali.

Kelompok 1 diberi larutan uji dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Kelompok 2 diberi larutan uji dengan konsentrasi 750 µg/mL. Kelompok 3 diberi larutan uji dengan konsentrasi 500 µg/mL. Kelompok 4 diberi larutan uji dengan konsentrasi 250 µg/mL. Kelompok 5 diberi larutan uji dengan konsentrasi 100 µg/mL. Kelompok 6 diberi air laut buatan sebanyak 5 ml sebagai kontrol. Setiap vial diletakkan dibawah penerangan lampu 40 Watt yang berjarak 20 cm selama 24 jam. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach, dimana setiap konsentrasi dilakukan 5 kali replikasi atau pengulangan dan dibandingkan dengan kontrol. Kriteria standar untuk menilai kematian larva *Artemia salina* Leach yaitu bila larva *Artemia salina* Leach tidak menunjukkan pergerakan selama 10 detik observasi atau pengamatan. Hitung persentase kematian (mortalitas) dan nilai probit dari tiap kelompok hewan uji ditentukan melalui tabel probit. Nilai LC₅₀ dapat dihitung dengan persamaan garis lurus tersebut dengan memasukkan nilai 5 (probit dari 50% kematian hewan uji) sebagai y sehingga dihasilkan x sebagai nilai log konsentrasi. Antilog nilai x tersebut merupakan nilai LC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian toksisitas akut ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap larva *Artemia salina* L dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) merupakan salah satu uji praskrining atau pendahuluan untuk mendapatkan aktivitas biologis yang sederhana untuk menentukan tingkat toksisitas akut suatu senyawa atau ekstrak dengan menggunakan *Artemia salina* L sebagai hewan uji.

Hewan uji yang digunakan pada pengujian toksisitas ialah *Artemia salina* L yang berada pada tahap nauplii atau telur menjadi larva, yaitu larva yang berumur 48 jam dan aktif bergerak. Uji toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina* yang berusia 48 jam ini dilakukan dengan menggunakan air laut buatan sebagai media. Pembuatan media air laut buatan ini dijadikan pengencer ekstrak yang akan dijadikan larutan induk. Adapun hal penting yang harus diperhatikan dalam pembuatan air laut buatan yaitu pada pH nya. pH yang didapatkan dari air laut buatan tersebut adalah 8. Derajat pH ini merupakan derajat pH yang baik karena larva dapat berkembang dengan baik dan ini berguna pada enzim-enzim untuk metamorfosis larva yang bekerja secara optimum pada rentang pH 8-9 (Reskianingsih, A. 2014).

Telur larva *Artemia salina* L sebanyak 100 mg dicuci terlebih dahulu, yakni dengan menaburkan dan direndam pada wadah berisi aquadest selama 1 jam lalu ditiriskan. Kemudian dimasukkan kedalam wadah penetasan yang berisi 1 liter air laut buatan dan didiamkan selama 2x24 jam. Masing-masing larutan uji dimasukan kedalam botol vial yang sudah terlebih dahulu dikalibrasi (5 mL). Kemudian, sebanyak 10 ekor larva udang *Artemia salina* L dimasukan kedalam masing masing vial dan didiamkan selama 1x24 jam dibawah penerangan lampu 40 watt dengan suhu sebesar 28°C.

Ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dibuat dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Konsentrasi ini merupakan larutan induk dimana sebanyak 100 mg ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dilarutkan kedalam 100 mL air laut buatan. Selanjutnya larutan induk diencerkan menjadi beberapa konsentrasi yang lebih kecil yaitu konsentrasi 750 µg/mL, konsentrasi 500 µg/mL, konsentrasi 250 µg/mL, konsentrasi 100 µg/mL, dan konsentrasi 0 µg/mL. Konsentrasi 0 µg/mL merupakan larutan kontrol yang hanya berisi air laut buatan saja. Adapun larutan kontrol digunakan sebagai perbandingan bahwa yang menyebabkan kematian pada larva adalah murni dari ekstrak/zat uji yang digunakan dan bukan karena dari air laut buatan tersebut.

Rata-rata kematian larva untuk masing-masing kelompok perlakuan diperoleh dari rata-rata jumlah total kematian larva dari setiap kelompok konsentrasi. Adapun kriteria standar untuk menilai kematian larva udang yaitu ketika larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama 10 detik pengamatan. Adapun data kematian larva *Artemia salina* Leach setelah 24 jam dapat dilihat pada tabel 1 sebagai berikut :

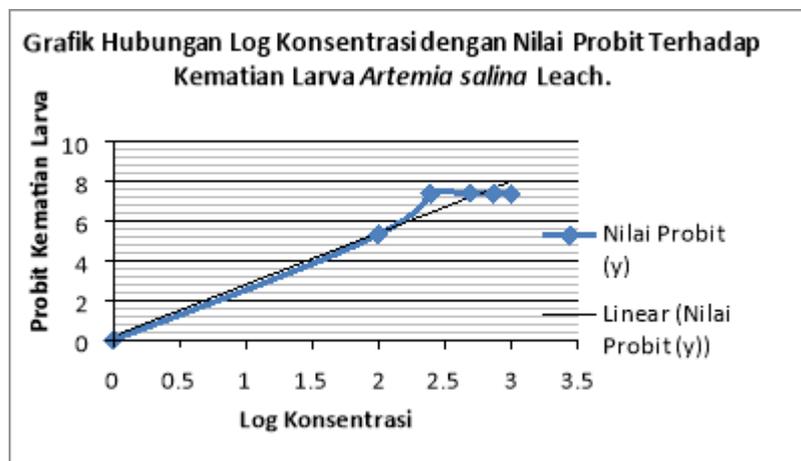
Tabel 1. Data kematian larva *Artemia salina* Leach Setelah 24 jam perlakuan

Konsentrasi Larutan Uji (µg/mL)	Log Konsentrasi	Replikasi					Rata-rata Kematian Larva	% Kematian Larva	Nilai Probit
		1	2	3	4	5			
0 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0%	0	
100 µg/mL	2	6	6	6	7	6	6,2	62%	5,31
250 µg/mL	2,39	10	10	10	10	10	10	100%	7,37
500 µg/mL	2,69	10	10	10	10	10	10	100%	7,37
750 µg/mL	2,87	10	10	10	10	10	10	100%	7,37
1000 µg/mL	3	10	10	10	10	10	10	100%	7,37

Pada tabel I menunjukkan angka kematian serta nilai persentase kematian tiap konsentrasi uji. Pada konsentrasi 0 µg/mL, tidak ada satupun larva yang mati dikarenakan pada konsentrasi 0 µg/mL hanya berisi air laut buatan saja. Hal ini menandakan bahwa kematian larva adalah murni dari ekstrak/zat uji yang digunakan dan air laut buatan tidak berpengaruh pada kematian larva. Pada konsentrasi 100 µg/mL, persentase kematiannya sebesar 62%. Kemudian pada konsentrasi 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, dan 1000 µg/mL persentase

kematiannya sebesar 100%. Ini menandakan bahwa semua larva pada konsentrasi tersebut mati. Dapat dilihat pada konsentrasi 250 µg/mL sudah menyebabkan 100% kematian pada larva. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi pula jumlah kematian larva. Hal ini sesuai dengan Harbone (1994), yang menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka sifat toksiknya akan semakin tinggi. Dari data tersebut, dapat dikatakan bahwa kematian larva udang *Artemia salina* L. disebabkan oleh sifat toksik dari ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) karena memiliki kandungan senyawa flavonoid dan saponin pada daun cengkeh yang sangat tinggi.

Pada penelitian ini diolah menggunakan analisis probit, selain menggunakan analisis probit data juga diolah dengan menggunakan *Microsoft excel* untuk mencari regresi garis linear. Dari grafik garis tersebut kemudian didapatkan persamaan $Y = m x + b$. Dimana y merupakan angka probit dan x merupakan log konsentrasi. Setelah itu didapatkan nilai R square (R^2). Nilai R^2 terletak antara 0-1, dan kecocokan model dikatakan lebih baik jika nilai R^2 mendekati 1 (Junaidi, 2015). Hasil yang diperoleh dibuat dalam bentuk grafik linear yang menunjukkan hubungan antara persentase kematian larva dengan persentase konsentrasi larutan.



Gambar 1. Grafik Hubungan Log Konsentrasi dengan Probit Kematian Larva

Persamaan regresi linear dari grafik diatas, digunakan untuk mencari nilai dari LC_{50} dengan cara mensubstitusikan nilai 50% sebagai y, sehingga didapatkan nilai $y = 5$ dan $x = 1,857$ dan nilai R^2 nya sebesar 0,9663.

Berdasarkan grafik pada gambar 3, konsentrasi 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL dan 1000 µg/mL menyebabkan rata-rata kematian larva tertinggi. Pada konsentrasi 100 µg/mL memiliki rata-rata kematian larva terendah. Sedangkan pada kelompok kontrol, tidak memiliki rata-rata kematian pada larva atau

berjumlah 0. Suatu ekstrak dikatakan toksik berdasarkan metode BSLT jika harga LC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm) (Carballo, dalam Cahyadi, R, 2009).

Pada hasil penelitian didapatkan bahwa nilai LC_{50} baik secara manual maupun dengan regresi linier *Ms.Excel* adalah 71,94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan nilai tersebut masuk kedalam rentang nilai LC_{50} 0-250 yang bersifat sangat toksik dan dapat menyebabkan kematian terhadap larva *Artemia salina* L. Hal ini disebabkan adanya senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalam daun cengkeh yaitu flavonoid dan saponin yang sangat tinggi sehingga sudah dapat mematikan larva meskipun dengan konsentrasi yang digunakan tidak terlalu tinggi. Mekanisme kematian larva *Artemia salina* L berhubungan dengan fungsi senyawa flavonoid dan saponin yakni flavonoid bertindak sebagai *stomach poisoning* atau sebagai racun perut, hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga larva mati kelaparan, sedangkan senyawa golongan saponin dapat mengikat oksigen yang terdapat didalam air sehingga larva *Artemia salina* L dapat mengalami kematian karena kekurangan oksigen.

Pada hasil penelitian ini pula, kemudian dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dari daun cengkeh yang dapat dikembangkan sebagai alternatif pengobatan antikanker. Hal ini didukung dengan adanya kandungan saponin yang juga berpotensi sebagai antikanker yang dapat bekerja dengan menginduksi *cell cycle arrest* dan apoptosis sel (Supriningrum R, 2016).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) memiliki efek toksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dan didapatkan nilai LC_{50} dari ekstrak etanol daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yaitu sebesar 71,9448 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada tim peneliti Riris Sagita Ardianti dan Institusi pendidikan Akademi Farmasi Yarsi Pontianak serta seluruh pihak yang telah membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Carballo, J. L. I., Inda, Z. L. H., Perez, 2000, "A Comparison Between Two Brine Shrimp Assay to Detect in Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Product", BMC Biotechnology, 2 (17): 1-5.
- Fadli, Suhaimi, Idris M, 2019, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) Dengan Metode BSLT (*Brine*

- Shrimp Lethality Test*). *Jurnal Medical Sains*, Volume 4 Nomor 1, Sekolah Tinggi Farmasi Muhammadiyah Cirebon, Cirebon
- Harbone J.B, 1996, *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Terbitan Kedua, Penerbit ITB, Bandung.
- Harmita dan Radji, M, 2008, *Analisis Hayati*, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, Hal: 76-78.
- Ketaren S.,1985, *Pengantar Teknologi Minyak Atsiri*, PN Balai Pustaka, Jakarta, Hal. 28-29, 246-248.
- Kunsah B, Astuti R., 2019, Uji Toksisitas Akut Kulit Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test. *The Journal of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologis Volume 2 Nomor 2*, Universitas Muhammadiyah, Surabaya.
- Lambiju E, Wowor P, Leman M., 2017, Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) Terhadap Bakteri *Enterococcus faecalis*. *Jurnal e-Gigi. Volume 5 Nomor 1*, Universitas Sam Ratulangi, Manado
- Mardisiwoyo S dan Rahamangunsudarso, 1987, *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang I*, Balai Pustaka, Jakarta, Hal 116.
- Mudjiman, Ahmad, 1989, *Udang Renik Air Asin (Artemia salina)*, Bhratara, Jakarta
- Nuralifah, Jabbar A, Parawansah, Iko R, 2018, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Notika (*Archboldiodendron caloserium* (Kobuski)) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Pharmauho Volume 4 Nomor 1*, Fakultas Farmasi Universitas Kedokteran Halu Oleo, Kendari, Hal. 1-5
- Priyanto, 2009, *Toksikologi Mekanisme Terapi Antidotum dan Penilaian Resiko*, Lembaga Studi dan Konsultasi Farmakologi, Jakarta, Hal: 156-167.
- Reskianingsih A, 2014, Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Buah *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), *Skripsi*, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.
- Talahatu D, Papilaya P, 2015, Pemanfaatan Ekstrak Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) Sebagai Herbisida Alami Terhadap Pertumbuhan Gulma Rumput Teki (*Cyperus rotundus* L.), *Volume 1 Nomor 2, Biopendix*, Ambon
- Zhang, S., Wang, Y., Meng, L., Li, J., Zhao, X., Cao, X., Jing, F. (2012). Isolation and Characterization of Antifungal Lipopeptides Produced By Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. *African Journal of Microbiology Research*, 6(8), hlm. 1747-1755.