

UJI FITOKIMIA DAN TOKSISITAS (*Brine Shrimp Lethality Test*) EKSTRAK ETANOL, FRAKSI ETIL ASETAT DAN FRAKSI ETANOL SISA DARI DAUN AJERAN (*Bidens pilosa* L.)

PHYTOCHEMICAL TEST AND TOXICITY (*Brine Shrimp Lethality Test*) IN ETHANOL EXTRACT, ETHYL ACETATE FRACTION AND RESIDUAL ETHANOL FRACTION OF AJERAN LEAVES (*Bidens pilosa* L.)

Nuraini Meti Audia*, Daniel, dan Eva Marliana

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua, Samarinda, 75123

*E-mail: metyaudia@gmail.com

Received: 11 May 2019, Accepted: 20 July 2020

ABSTRACT

Phytochemical test and toxicity in ethanol extract, ethyl acetate fraction and residual ethanol fraction of ajeran leaves (*Bidens pilosa* L.) has been done. The method used to determine secondary metabolites is qualitative test and the value of Lethal Concentration (LC₅₀) with the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Phytochemical test results showed that the ethanol extract and ethyl acetate fraction contained flavonoid, steroid and phenol compound. Residual ethanol fraction contained flavonoid and phenol compound. Toxicity test showed ethanol extract had LC₅₀ value of 862.19 ppm. Ethyl acetate fraction has LC₅₀ value of 8.26 ppm. Residual ethanol fraction had LC₅₀ value of 275.24 ppm. The results of the toxicity test can be concluded that the ethyl acetate fraction very toxic category, ethanol extract and residual ethanol fraction included toxic category. The results that obtained from GC-MS characterization were steroid.

Keywords: *Ajeran (Bidens pilosa L.), Phytochemical Test, Toxicity, Brine Shrimp Lethality Test, GC-MS.*

PENDAHULUAN

Indonesia menjadi satu diantara tujuh negara didunia yang memiliki kekayaan alam hayati. Keanekaragaman hayatinya dipandang sebagai aset nasional yang berharga bila ditinjau dari kandungan senyawa kimia alam yang dikandungnya. Keanekaragaman hayati akan menghasilkan keanekaragaman senyawa kimia (*chemodiversity*) sebagai sebuah kebutuhan hidup makhluk hidup sebagai obat-obatan, kosmetik, inseksida dan sebagai bahan dasar sintesa senyawa organik yang lebih berguna [1].

Ajeran (*Bidens pilosa* L.) adalah suatu tanaman yang bermula dari Amerika Selatan dan sekarang ditemukan hampir semua negara wilayah tropis dan subtropis di seluruh dunia termasuk Indonesia. Seluruh bagian *Bidens pilosa* L. termasuk daun, bunga akar dan batang dalam kondisi kering maupun segar sering digunakan untuk bahan obat tradisional dan hampir seluruh bagian pada tanaman Ajeran (*Bidens pilosa* L.) memiliki kandungan flavonoid [2].

Penelitian Ariyanti (2007) menunjukkan ekstrak metanol dan fraksi air herbal ketul (*Bidens pilosa* L.) terdapat senyawa flavonoid. Uji aktivitas antioksidan menunjukkan ekstrak metanol herbal ketul (*Bidens pilosa* L.) memiliki IC₅₀ 44,77 µg/mL sedangkan fraksi air memiliki IC₅₀ 97,40 µg/mL [3]. Kemudian pada penelitian Nurasini (2009) tumbuhan herbal ketul (*Bidens pilosa* L.) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dibandingkan ekstrak metanol. Nilai IC₅₀ pada fraksi etil asetat sebesar 1,79 µg/mL lalu pada ekstrak metanol sebesar 44,77 µg/mL [4].

Berdasarkan penjelasan diatas maka penelitian terhadap daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.) ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis metabolit sekunder, tingkat toksisitas pada larva udang (*Arthemisa salina* L.) melalui uji mortalitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* dengan menggunakan ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa. Kemudian fraksi paling aktif dilakukan karakterisasi menggunakan GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian yakni botol reagen gelap, tiang statif, klem, corong kaca, spatula, labu *erlenmeyer*, blender, neraca analitik, beker gelas, corong pisah, pipet tetes, tabung reaksi, batang pengaduk, gelas ukur, *rotary evaporator*, toples maserasi, pipet mikro GC-MS dan labu ukur.

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain seperti daun Ajeran, etil asetat, etanol, aquades, n-heksana, asam asetat anhidrat, aluminium foil, pereaksi dragendorff, larva udang *Artemia*, asam nitrit, DMSO (dimetil sulfoksida), FeCl_3 1 %, HCl, serbuk Mg, air laut, H_2SO_4 1 M, air laut, kantong plastik hitam, kertas saring, kapas, tisu, plastik *wrap* dan kertas label.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi daun Ajeran

Sampel daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.) telah dihaluskan, ditimbang kemudian dimaserasi dengan etanol, diekstraksi sampai larutan ekstrak tidak berwarna lagi. Filtrat yang diperoleh kemudian disaring dengan corong kaca dan kertas saring. Hasil ekstraksi selanjutnya dipekatkan dengan memakai *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak yang lebih pekat.

Uji fitokimia

Uji alkaloid (uji Meyer's dan Dragendorff)

Ekstrak kasar, fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa daun Ajeran ditambahkan 10 mL kloroform-amoniak, lalu disaring ke dalam tabung reaksi. Filtrat kemudian ditambah beberapa tetes asam sulfat 2 M lalu dikocok sehingga membentuk dua lapisan. Lapisan asam yang terdapat pada fase atas dipipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah pereaksi Meyers dimana 5 gram KI dilarutkan dalam 90 mL air lalu ditambahkan sedikit demi sedikit HgCl_2 sambil diaduk kemudian diencerkan sampai volume 100 mL dan pereaksi Dragendorff (campuran $\text{Bi}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ larutan KI dan asam nitrat). Adanya alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna putih dengan pereaksi Meyer dan terbentuknya endapan jingga sampai dengan merah coklat dengan pereaksi Dragendorff [5].

Uji steroid dan triterpenoid (uji Lieberman-Burchard)

Ekstrak kasar, fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa daun Ajeran ditambahkan CH_3COOH anhidrat dan H_2SO_4 pekat. Hasil positif dari steroid adalah adanya warna hijau atau biru sedangkan uji

positif Triterpenoid terbentuknya warna ungu dan merah [6].

Uji flavonoid

Ekstrak kasar, fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa daun Ajeran ditambah dengan 100 mL air panas, dididihkan sekitar 5 menit, lalu disaring. Filtrat sebanyak 5 mL kemudian ditambah sedikit 1 mL HCl pekat dan Mg lalu dikocok. Hasil positif flavonoid terbentuknya warna jingga, kuning atau merah [7].

Uji fenolik

Ekstrak kasar, fraksi fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa dari daun Ajeran ditambahkan air panas lalu ditambah beberapa tetes FeCl_3 1 %. Hasil positif yakni terbentuk warna hitam pekat, hijau, ungu, merah atau biru [6].

Uji saponin

Ekstrak kasar, fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa daun Ajeran ditambahkan sedikit air panas kemudian dikocok. Hasil positif saponin yakni adanya busa sekitar 1-10 cm yang bertahan selama 10 menit [8].

Uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Sebanyak ± 10 mg telur udang (*Artemia salina* L.) ditambahkan 100 mL air laut yang telah di saring. Selanjutnya diberi pencahayaan lampu TL agar menetas sempurna. Setelah 24-48 jam telur udang menetas dan siap untuk diuji cobakan [9].

Ekstrak pekat etanol dan fraksi-fraksinya sebanyak 1 mg yang sudah ditimbang sebelumnya, dilarutkan dengan menggunakan DMSO (dimetil sulfoksida) sebanyak 100 μL dan dihomogenkan. Sampel diencerkan dengan menggunakan aquades sebanyak 150 μL hingga volume pekat mencapai 250 μL dan diencerkan untuk selanjutnya dipipet 200 μL dan diencerkan kembali menggunakan 600 μL aquades hingga volume pekatnya menjadi 800 μL , sehingga didapatkan konsentrasi sampel 1000 ppm. Sampel dengan konsentrasi 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm; 31,2 ppm; 15,6 ppm; 7,8 ppm; dibuat dari pengenceran sampel konsentrasi 1000 ppm. Larutan kontrol dibuat dengan perlakuan yang sama seperti sampel tanpa penambahan ekstrak [9].

Masing-masing sampel yang telah diencerkan ditambahkan 100 μL air laut yang berisi 8-11 larva udang. Setiap sampel diberi perlakuan uji sebanyak tiga kali (triplo).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Fitokimia

Berdasarkan hasil uji fitokimia terhadap ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.) diketahui kandungan senyawa metabolit sekunder seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia berbagai jenis ekstrak daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.).

Jenis Senyawa	Jenis Ekstrak		
	Ekstrak kasar etanol	Fraksi etil asetat	Fraksi etanol sisa
Alkaloid	-	-	-
Saponin	-	-	-
Steroid	+	+	-
Flavonoid	+	+	+
Fenolik	+	+	+

Ket : (+) Mengandung senyawa metabolit sekunder
 (-) Tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

Hasil identifikasi kandungan metabolit sekunder dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat yakni steroid, flavonoid dan fenolik. Sedangkan pada fraksi etanol sisa terdapat flavonoid dan fenolik.

Uji Toksisitas (BSLT)

Berdasarkan perhitungan menggunakan analisis probit SAS ekstrak etanol, fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa dari daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.) diperoleh nilai LC₅₀ (*Lethal Concentration 50%*) pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai LC₅₀ uji mortalitas larva udang terhadap berbagai jenis ekstrak daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.).

Jenis Ekstrak	LC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etanol	862,19
Fraksi etil asetat	8,26
Fraksi etanol sisa	275,24

Berdasarkan hasil uji mortalitas larva udang dari ekstrak kasar etanol diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 862,19 ppm; pada ekstrak fraksi etil asetat diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 8,26 ppm; lalu pada ekstrak fraksi etanol sisa diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 275,24 ppm. Nilai ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut, ekstrak sampel mampu membunuh larva udang sampai 50% populasi. Nilai LC₅₀ dari uji mortalitas larva udang diperoleh dengan menggunakan analisa probit SAS (*Statistical Analysis System*).

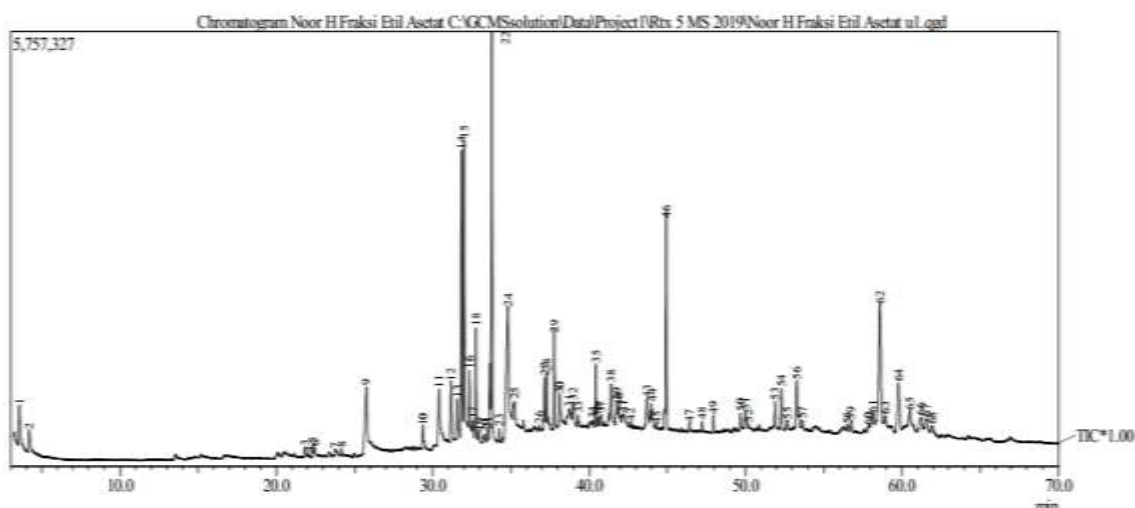
Dari hasil yang didapatkan yaitu ekstrak fraksi etil asetat memiliki toksisitas paling tinggi terhadap

larva udang yang ditunjukkan dengan nilai LC₅₀ paling kecil yaitu 8,26 ppm. Nilai ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 8,26 ppm ekstrak fraksi etil asetat mampu membunuh larva udang sampai 50% populasi. Semakin kecil nilai LC₅₀ (*Lethal Concentration 50%*) dari suatu sampel maka semakin tinggi tingkat toksisitasnya.

Tingginya toksisitas dari fraksi etil asetat terhadap larva udang jika dibandingkan dengan ekstrak etanol dan fraksi etanol sisa diperkirakan karena konsentrasi kandungan senyawa flavonoid dan fenolik yang cukup tinggi. Diantara metabolit sekunder tersebut, flavonoid diindikasikan memiliki pengaruh yang besar dimana pada konsentrasi tertentu, flavonoid menjadi sangat toksik. Flavonoid merupakan salah satu jenis metabolit sekunder yang beracun dan mempunyai bau yang sangat menyengat. Pada serangga flavonoid akan menyerang sistem pernapasan sehingga menyebabkan kematian. Flavonoid dapat menghambat aktivitas DNA Topoisomerase I/II dan mengaktifkan endonuklease yaitu enzim yang bertindak memotong DNA sehingga terjadi fragmentasi. Mekanisme ini mampu memacu program kematian sel [10]. Selain itu, mekanisme kematian larva berhubungan dengan kandungan senyawa tersebut dimana bertindak sebagai *stomach poisoning* (racun perut). Apabila senyawa-senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva maka alat pencernaannya akan terganggu dan senyawa tersebut dapat menghambat sistem perasa pada daerah mulut larva sehingga larva tidak mampu untuk mengenali makanannya sehingga menyebabkan larva mati.

Pada ekstrak kasar etanol memiliki nilai LC₅₀ 862,19 ppm yang berarti tingkat bioaktivitas pada ekstrak kasar lebih rendah dibandingkan fraksi etil asetat dan fraksi etanol sisa. Hal ini dimungkinkan karena rendahnya konsentrasi pelarut yang terkandung didalam ekstrak etanol tersebut.

Walaupun tingkat toksisitas dari ekstrak etanol dan fraksi etanol sisa lebih kecil dibanding fraksi etil asetat, namun semua ekstrak tersebut tetap dikatakan toksik karena berdasarkan studi yang dilakukan Meyer (1982), senyawa kimia dikatakan berpotensi aktif bila mempunyai nilai LC₅₀ kurang dari 1000 ppm [9]. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi etanol sisa berpotensi aktif karena nilai LC₅₀ yang dihasilkan kurang dari 1000 ppm.

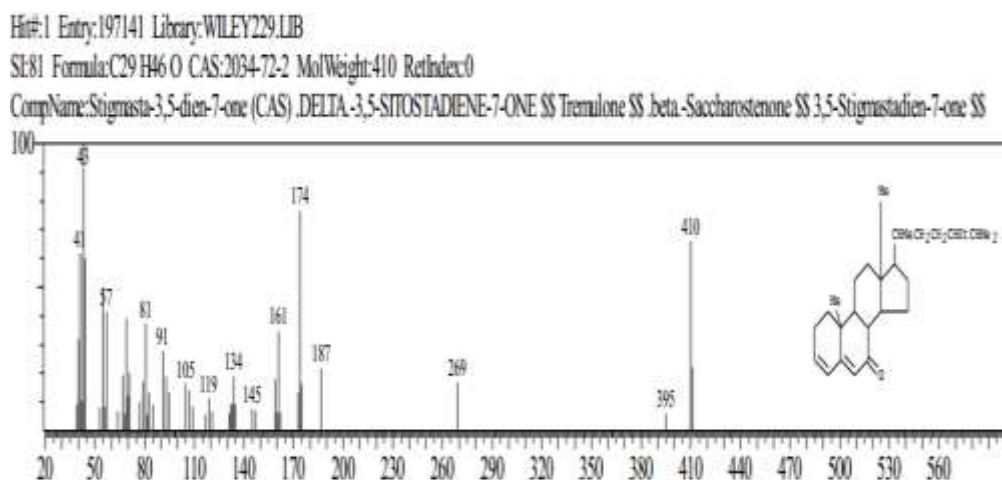


Gambar 1. Kromatogram GC-MS fraksi etil asetat daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.).

Tabel 3. Hasil analisa GC-MS fraksi etil asetat daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.).

Peak	Waktu Retensi (menit)	Persentase Area (%)	Nama Senyawa
1	3,567	1,51	<i>Isobutenyl methyl ketone</i>
2	2,196	0,95	<i>2-pentanone, 4-hydroxy-4-methyl</i>
3	21,828	0,29	<i>Methyl 1,1-dimethyl-4-indanyl ketone</i>
4	22,042	0,11	<i>5,9-tetradecadiyne</i>
5	22,333	0,30	<i>3,6-dimethyl-4-octyn-3,6-diol</i>
6	22,458	0,25	<i>2-phenyl-4-penten-2-ol</i>
7	23,758	0,34	<i>3-buten-2-one, 4-(2,5,6,6-tetramethyl-2-cyclohexen-1-yl)</i>
8	24,178	0,19	<i>1,2,3,6-tetrahydropyridine, 1-methyl-5-phenyl-</i>
9	25,762	3,08	<i>Dodecanoid acid (CAS) lauric acid</i>
10	29,371	0,71	<i>3-tetradecene, (Z)-</i>
11	30,421	2,63	<i>Tetradecanoic acid</i>
12	31,189	1,93	<i>2-cyclohexen-1-one,4-hydroxy-3,5,6-trimethyl-4-(3-oxo-1-butenyl)</i>
13	31,580	1,51	<i>Isopropyl myristate</i>
14	31,843	5,63	<i>1-Octadecyne</i>
15	32,003	7,71	<i>2-pentadecanone,6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone</i>
16	32,368	2,03	<i>1-octadecine</i>
17	32,575	0,56	<i>7-tridecanone</i>
18	32,768	2,38	<i>3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol</i>
19	32,975	0,28	<i>1-decanol, 2-ethyl-(CAS)</i>
20	33,307	0,38	<i>Octadecane, 1-(ethenyloxy)</i>
21	33,508	0,30	<i>2,3,7-trimethyloctanal</i>
22	33,781	10,50	<i>Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl palmitate</i>
23	34,278	0,34	<i>2,5-dimethylcyclohexanol</i>
24	34,818	8,00	<i>Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid</i>
25	35,233	1,59	<i>Citronellal</i>
26	36,824	0,15	<i>9-octadecanone</i>
27	37,161	1,17	<i>11,14-eicosadienoic acid, methyl ester (CAS)</i>
28	37,285	1,62	<i>9,12-Octadecadienoul chloride, (Z,Z)</i>
29	37,780	2,17	<i>Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)</i>
30	38,138	1,62	<i>Decanamide, N-(2-hydroxyethyl)</i>
31	38,744	1,85	<i>Phytol</i>
32	38,977	1,04	<i>9-Octadecenamide</i>
33	39,302	0,39	<i>Acetic acid, dodecyl ester (CAS)</i>

34	40,238	0,51	9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester (CAS)
35	40,425	1,28	Hexane, 1,1-oxybis-(CAS) n-hexyl ether
36	40,583	0,20	9-Octadecanone
37	40,776	0,43	8,11-octadecadiynoic acid, methyl ester
38	41,397	2,06	9-octadecen-1-ol, (Z)- (CAS) cis-9-octadecen 1-ol
39	41,787	0,83	Octane, 2-cyclohexyl
40	41,908	0,78	4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide
41	42,224	1,18	9-octadecen-1-ol, (Z)-(CAS) cis-9-octadecen-1-ol
42	42,656	0,20	9-Octadecenamide, (Z)
43	43,707	1,46	2(1H)-naphthalenone,3,4,5,6,7,8-hexahydro-1,1-dimethyl
44	44,027	1,12	7-octadecanone
45	44,325	0,15	1-iodo-2-methylundecane
46	44,939	4,93	1,2-benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester
47	46,415	0,20	Tricosanoic acid, methyl ester(CAS)
48	47,223	0,27	12-tricosanone
49	47,951	0,36	Eicosanoic acid, methyl ester
50	49,687	0,56	Furan 4,5-diethyl-2,3-dimethyl-(CAS) 2,3-dimethyl-4,5-diethyl-2,3-dihidrofuran
51	50,001	0,66	17-pentatriacontene (CAS)
52	50,192	0,09	12-tricosanone
53	51.898	0,79	Beta.-ionon-5,6-epoxide
54	52.304	1,19	4,6-cholestadien-3.beta.-ol
55	52.669	0,34	Dihydroedulan IIA
56	53.283	1,98	Cholesta-3,5-diene (CAS) cholesterilene
57	53.637	0,34	Cholest-5-ene, 3-bromo, (3.beta.)-
58	56.514	0,20	Ergosta-5,7-dien-3-ol, (3.beta.)-
59	56.765	0,40	Ergosta-5,7-dien-3-ol (3.beta.)-
60	57,858	0,37	Cyclooctenone, dimer
61	58,145	0,91	4,6-cholestadiene-3-one
62	58,605	6,68	Methyl commate
63	58,953	0,58	Ergosta-7,22-dien-3-ol, (3.beta.,22E)- (CAS)
64	59,789	2,35	Lupeol
65	60,519	1,09	Stigmasta-3,5-dien-7-one (CAS)
66	61,220	0,85	Cycloeucalemol
67	61,573	0,77	Stigmast-4-en-3-one (CAS)
68	61,944	0,40	Pentane,1,4-diphenyl-



Gambar 2. Spektrogram MS senyawa Stigmasta-3,5-dien-7-one (CAS).

Berdasarkan data pada Tabel 3, terdapat tiga golongan senyawa utama yang terkandung dalam ekstrak fraksi etil asetat daun Ajeran (*Bidens pilosa* L.) yakni asam lemak, steroid dan alkana. Diantara senyawa-senyawa tersebut yang bersifat toksik terhadap *Artemia salina* L. adalah senyawa steroid. Berdasarkan persen area terbesar maka senyawa yang bersifat toksik adalah *Sigmasta-3,5-dien-7-one* (CAS) dengan waktu retensi 60,52 menit dan luas puncak sebesar 1,09 %. Senyawa ini merupakan salah satu senyawa steroid. Spektrogram MS senyawa *Sigmasta-3,5-dien-7-one* (CAS) dapat dilihat pada Gambar 2.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil identifikasi kandungan metabolit sekunder dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat yakni steroid, flavonoid dan fenolik. Sedangkan pada fraksi etanol sisa terdapat flavonoid dan fenolik.
2. Pada ekstrak etanol didapat nilai LC₅₀ sebesar 862,19 ppm. Pada ekstrak fraksi etil asetat didapat nilai LC₅₀ sebesar 8,26 ppm. Kemudian pada fraksi etanol sisa didapat nilai LC₅₀ sebesar 275,24 ppm.
3. Hasil identifikasi kandungan kimia pada fraksi etil asetat menggunakan analisa GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) menghasilkan 68 puncak senyawa dan mengandung senyawa dominan steroid yaitu *Sigmasta-3,5-dien-7-one* (CAS).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Hakim A dan Jufri A. W. 2001. *Aktivitas antimalaria dan analisis metabolit sekunder kayu dan kulit batang Artocarpus Odoratissimus Blanco*. Mataram: Universitas Mataram.
- [2] Bartolome A. P. Villasenor I. M. dan Yang W. 2013. *Bidens pilosa* L (Asteraceae): Botanical Properties, Traditional Uses, Phytochemisrty, and Pharmacology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicice*. 2: 1-3.
- [3] Ariyanti N. K. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi air ekstrak metanolik herba ketul (*Bidens pilosa* L.). *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- [4] Nursarini N. M. R. 2007. Uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak metanolik herba ketul (*Bidens Pilosa* L.). *Skripsi*. Yogyakarta: UGM.
- [5] Darwis D. 2000. Teknik dasar laboratorium dalam penelitian senyawa bahan alam hayati. *Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia Di Dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati*. Padang: Universitas Andalas.
- [6] Kadarisman I. 2000. *Isolasi dan identifikasi senyawa kimia bioaktif dari Rimpang Bangle (Zingiber Cassumunar Roxb)*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [7] Chozin A. 1996. Uji brine shrimp dan analisis kandungan kimia fraksi ekstrak methanol 95% daun Suren, *Tuna Sureni (BL)*. *Prosiding Symposium Penelitian Bahan Obat Alami VIII. Perhitungan Penelitian Bahan Kimia Alami*. Balitto: Bogor.
- [8] Harborne J. B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB.
- [9] Meyer B. N. N. R. Ferrigni, J. E. Putman, L. B. Jacobsen, D. E. Nichol dan J. L. Melaughlin. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medika*. 45: 31-34.
- [10] Pebriana R. B, Bantari W. K.W, Widayanti E., Atifah N. S.W, Wijayanti T. R., Riyanto S. dan Meiyanto E. 2008. Pengaruh ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) terhadap pemacuan apoptosis sel kanker payudara. *PHarmacon*. 9(1): 21-26.