

Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak Etil Asetat Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) serta Uji Sitotoksik Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Norman Ferdinal^{a*}, Muhamad Fadli^a, Rizki Septiardi^a, Adlis Santoni^a

^aLaboratorium Kimia Organik Bahan Alam, Departemen Kimia FMIPA, Universitas Andalas

*Corresponding author: ferdinalnorman@yahoo.co.id

Abstract

The bay plant (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) is a member of the *myrtaceae* family. The most widely used part of the bay plant is the bay leaf. The leaves of this plant are often used as traditional medicine to treat gout, diarrhea, diabetes, and high blood pressure. This study aims to isolate and determine the characteristics of triterpenoid compounds from ethyl acetate extract of bay leaves. Isolation was carried out by column chromatography method with SGP (Step Gradient Polarity) elution system, then the isolated compound was purified by recrystallization method and obtained in the form of white crystals weighing 0.0188 g. TLC results showed a single purple spot after being treated with Liebermann Buschard reagent with a melting point range of 137-139 °C. The results of the UV spectrum data showed no conjugated double bonds and the results of the FTIR spectrum data showed the presence of hydroxyl groups, C-O alcohols, C-H alkanes, C=C alkenes, geminal dimethyl which are characteristic of triterpenoid compounds. Cytotoxic activity testing was carried out using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. Ethyl acetate extract and methanol extract had strong cytotoxic activity with LC50 values 316.23 mg/L and 234.42 mg/L respectively, while the hexane extract was weak with an LC50 value of 1148.15 mg/L.

Keywords

syzygium polyanthum (wight) Walp
triterpenoids
cytotoxic

Received: April 2023

Revised: May 2023

Accepted: May 2023

Available online: May 2023

1. Pendahuluan

Tanaman salam adalah tanaman yang telah banyak dikenal oleh masyarakat. Bagian tanaman salam yang sering dimanfaatkan adalah daun salam. Daun salam banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai bumbu dapur masakan karena memiliki aroma khas. Selain itu, daun salam sering dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai pengobatan alternatif karena tumbuhan ini mudah didapatkan di kalangan masyarakat. Di beberapa daerah Indonesia tanaman ini memiliki nama lokal, seperti Salam (Jawa, Sunda, dan Madura), Kastolam (Kangean dan Sumenep), dan Meselengan (Sumatera) [1].

Pemanfaatan tumbuhan ini sebagai obat maupun untuk bumbu sebagian besar berhubungan dengan kandungan metabolit sekundernya khususnya essensial oil atau minyak atsiri [2]. Daun salam mempunyai kandungan kimia minyak atsiri (sitril, eugenol dan

methyl chavicol) dan tanin [3]. Oleh karena memiliki kandungan senyawa kimia yang

banyak, daun salam sering dimanfaatkan untuk mengobati penyakit, diare, tekanan darah tinggi, dan kolesterol dengan menurunkan kadar kolesterol total dan masih banyak penyakit lainnya. Selain itu, daun salam juga mengandung beberapa vitamin, diantaranya vitamin C, vitamin A, vitamin E, vitamin B6, vitamin B12, dan asam folat.

Tanaman salam memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti antihipertensi, antidiabetes, antioksidan, antiinflamasi dan antibakteri [4]. Senyawa kimia yang terdapat pada daun salam dapat berperan sebagai antibakteri seperti alkaloid, tanin, flavonoid, minyak atsiri, saponin dan triterpenoid [5].

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan uji skrining fitokimia yang menunjukkan metabolit sekunder yang didapatkan pada ekstrak heksana alkaloid

dan steroid. Pada ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol, terkandung senyawa flavonoid, fenolik, alkaloid, triterpenoid, dan steroid. serta uji aktivitas antibakteri pada ekstrak metanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak heksana yang menunjukkan ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang baik. [6].

Uji sitotoksik merupakan uji *in vitro* dengan menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi tingkat ketoksikan suatu senyawa. Uji sitotoksik dapat memberikan informasi konsentrasi obat yang masih memungkinkan sel mampu bertahan hidup. Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) pertama kali dilakukan oleh Meyer, dkk dan dapat digunakan sebagai petunjuk untuk senyawa sitotoksik, antiparasit, dan insektisida. Pada pengujian aktivitas dengan metode BSLT digunakan larva *Artemia salina* [7].

Senyawa yang bersifat sitotoksik juga secara umum menunjukkan sifat toksiknya terhadap *Artemia salina*. Uji toksisitas akut pada suatu senyawa terhadap hewan uji *Artemia salina* dapat digunakan sebagai uji pendahuluan pada penelitian yang mengarah ke uji sitotoksik, karena ada hubungan antara uji toksisitas akut dengan uji sitotoksik jika nilai LC_{50} dari uji toksisitas akut $< 1000 \mu\text{g/mL}$ [8]. Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Selain itu, metoda ini juga mudah dikerjakan murah, cepat dan cukup akurat [9].

Produksi metabolit sekunder pada suatu tanaman baik secara kuantitatif dan kualitatif sangat bervariasi dan dipengaruhi oleh lingkungan.

Pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak etil asetat daun salam yang diperoleh dari kota Padang dan uji sitotoksik dengan metoda BSLT.

2. Bahan dan Metoda

2.1. Bahan Kimia

Bahan yang digunakan pada penelitian adalah ekstrak etil asetat daun salam yang diperoleh dari penelitian sebelumnya, heksana, etil asetat, metanol, silika gel 60 F254, plat KLT pereaksi Liebermann Burchard, kapas, larva udang *Artemia salina*, air laut dan dimetil sulfoksida (DMSO).

2.2. Peralatan

Alat digunakan pada penelitian adalah oven, botol reagen, kolom kromatografi, botol vial, neraca analitik, gelas ukur, gelas piala, rotary evaporator, pipa kapiler, lampu UV (λ 254 nm dan 365 nm), melting point

apparatus, spektroskopi UV-Vis, dan spektroskopi FTIR.

2.3. Prosedur Kerja

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak etil asetat di KLT terlebih dahulu sebelum di kromatografi kolom. Hasil KLT ini dapat dilihat pola noda yang dihasilkan menggunakan sinar UV $\lambda = 254$ nm dan $\lambda = 365$ nm. Berdasarkan pola noda yang dihasilkan, maka dapat ditentukan sistem elusi yang digunakan untuk pemisahan senyawa metabolit sekunder menggunakan kromatografi kolom nantinya, metoda elusi yang digunakan untuk kromatografi kolom yaitu metoda SGP (step gradient polarity).

Kromatografi Kolom

Sampel ekstrak etil asetat daun salam (sebanyak 20 g) dipreabsorpsi terlebih dahulu untuk digunakan pada kromatografi kolom. Sampel dimasukkan ke dalam lumpang dan ditambahkan silika gel sedikit demi sedikit dengan perbandingan sampel dan silika gel (1:1). Kemudian digerus secara perlahan sampai terbentuk bubuk yang halus dan dimasukkan ke dalam desikator agar sampel kering. Sampel yang telah dipreabsorpsi digunakan untuk proses pemisahan menggunakan kromatografi kolom. Pemisahan senyawa metabolit sekunder dari ekstrak etil asetat menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam silika gel 60 F254 dan fasa gerak heksana, dan etil asetat.

Fasa diam silika gel terlebih dahulu dipanaskan pada suhu 120°C selama 30 menit, kemudian dibuat bubur dengan pelarut heksana dan dimasukkan perlahan ke dalam kolom, dimana pada bagian dasar kolom telah diberi kapas sebagai penyaring. Pada saat memasukkan bubur silika ke dalam kolom harus terisi pelarut heksana sepertiga dengan kondisi kran terbuka. Sampel yang telah dipreabsorpsi dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan. Kemudian sampel dielusi dengan metoda SGP (step gradient polarity) dengan peningkatan kepolaran dari heksana 100% sampai etil asetat 100%.

Hasil elusi (eluat) dari kolom ditampung dengan botol vial 10 mL dan eluat dengan interval lima vial dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) untuk melihat pola noda dan nilai R_f yang sama. Eluat yang memperoleh pola (KLT) yang sama digabung menjadi satu fraksi, maka didapatkan 26 fraksi. Fraksi 11-16

(vial 340-902) teridentifikasi senyawa triterpenoid setelah diberi pereaksi Liebermann Burchard pada plat KLT dengan menunjukkan adanya warna ungu pada spot noda. Kemudian fraksi 11-16 digabungkan dan diperoleh dengan massa berat 1,1 gram, selanjutnya dimurnikan lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom kembali.

Pada tahap rekromatografi kolom ini juga dilakukan packing kolom dan preabsorpsi sampel dengan cara yang sama dengan kolom awal. Fraksi 11-16 direkromatografi kembali dengan menggunakan sistem elusi secara SGP dengan eluen heksana : etil asetat. Eluat ditampung ke dalam vial 10 mL kemudian setiap vial interval 5 di KLT untuk melihat pola noda dan nilai R_f yang sama. Senyawa dengan pola pemisahan yang sama digabungkan menjadi satu fraksi dan didapatkan 19 subfraksi. Pada subfraksi 2, vial 41- 46 menunjukkan adanya kristal seperti jarum berwarna berwarna putih dengan sedikit pengotor dan kemudian dilakukan monitoring dengan KLT. Selanjutnya dilakukan pemurnian hingga didapatkan senyawa murni.

Senyawa murni dilakukan pengujian titik leleh, karakterisasi dengan spektroskopi ultraviolet (UV-Vis) dan Inframerah.

Uji Kemurnian dan Karakterisasi

Uji Kromatografi Lapis Tipis

Senyawa hasil permurnian dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT). Senyawa murni dilarutkan dengan pelarut heksana dan ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dengan beberapa perbandingan eluen heksana : etil asetat (9.5:0.5), (9:1), (8:2) dan (7.5:2.5). Hasil elusi tersebut dilihat pola noda menggunakan pengungkap noda lampu UV $\lambda 254$ nm dan $\lambda 365$ nm. Hasil KLT pada sinar UV tidak menunjukkan adanya spot noda dan dilakukan dengan pengujian pereaksi Liebermann Burchard untuk mengidentifikasi senyawa triterpenoid. Hasilnya menunjukkan adanya spot noda tunggal berwarna ungu.

Pengukuran Titik Leleh.

Senyawa hasil isolasi dimasukan ke dalam pipet kapiler melting point apparatus kemudian dibiarkan temperatur alatnya naik sampai senyawa yang diuji meleleh kemudian dicatat temperatur saat senyawa meleleh.

Spektroskopi UV-Vis dan FTIR

Senyawa hasil isolasi dikarakterisasi dengan alat spektrofotometer UV-Vis, senyawa murni dilarutkan

dengan pelarut heksana kemudian diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 200-400 nm.

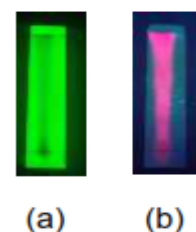
Uji aktivitas sitotoksik dengan metoda BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)

Ditimbang ekstrak heksana, etil asetat dan metanol sebanyak 100 mg dan dilarutkan dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas sehingga larutan induk dengan konsentrasi 1000 mg/L didapatkan. Dari larutan induk diencerkan untuk mendapatkan variasi konsentrasi masing-masing 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ dan 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Telur udang *Artemia salina* diteteskan pada tabung kaca yang telah berisi air laut dilengkapi dengan aerator dan lampu penerangan. Ditunggu selama 48 jam hingga larva udang menetas. Setiap larutan uji yang telah dibuat dimasukkan kedalam botol vial lalu diuapkan pada suhu kamar. Selanjutnya, sebanyak 50 μL larutan DMSO ditambahkan sampai semua larut, kemudian ditambahkan 3 mL air laut terhadap masing-masing larutan uji. Sepuluh ekor larva udang *Artemia salina* dimasukkan kedalam botol vial, kemudian cukupkan volumenya sampai 5 mL dengan air laut. Dibiarkan selama 24 jam dihitung larva udang yang mati dan dilakukan analisis untuk menentukan nilai LC_{50} [10].

3. Hasil dan Diskusi

3.1 Uji Kromatograf Lapis Tipis Pendahuluan Ekstrak Etil Asetat Daun Salam (*Syzygium Polyanthum* (Wight) Walp.)

Hasil dari uji kromatografi lapis tipis (KLT) kurang baik dalam pemisahan, sehingga dilakukan proses isolasi dengan metoda elusi SGP (step gradient polarity) dengan perbandingan eluen heksana : etil asetat. Tujuan digunakan metoda ini untuk didapatkan pola pemisahan yang sesuai dengan tingkat kepolarannya.



Gambar 1. Hasil KLT pendahuluan pada ekstrak etil asetat daun salam dibawah lampu UV: (a) $\lambda 254$ nm dan (b) $\lambda 365$ nm.

3.2 Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder

Subfraksi 2 (vial 41-46) terdapat adanya kristal putih dengan sedikit pengotor sehingga dilakukan teknik pemurnian lebih lanjut dengan cara rekristalisasi. Prinsip rekristalisasi adalah pemurnian zat padat dari campuran atau pengotor dengan cara pengkristalan kembali zat tersebut setelah dilarutkan dengan pelarut yang cocok [11].

Subfraksi 2 direkristalisasi dengan cara melarutkan kristal menggunakan pelarut heksana, kemudian dipisahkan larutannya. Larutan diuapkan dan kristalnya dicuci dengan metanol. Dilakukan pengulangan dengan cara yang sama sampai didapatkan noda tunggal berwarna ungu setelah diberi pereaksi Liebermann Burchard dan diperoleh senyawa murni seberat 0,0188 g. Senyawa murni dilakukan pengujian titik leleh, karakterisasi dengan spektroskopi ultraviolet (UV-Vis) dan Inframerah.



Gambar 2. Kristal putih hasil pemurnian dengan rekristalisasi

3.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil uji kromatografi lapis tipis dimonitor bawah lampu UV $\lambda 254$ nm dan $\lambda 365$ nm tidak ada spot noda, namun setelah diberi pereaksi Liebermann Burchard terdapat spot noda tunggal berwarna ungu yang menandakan bahwa senyawa tersebut merupakan senyawa triterpenoid dan sudah murni [12].

Tabel 1. Hasil uji kromatografi lapis tipis (KLT) senyawa hasil isolasi.

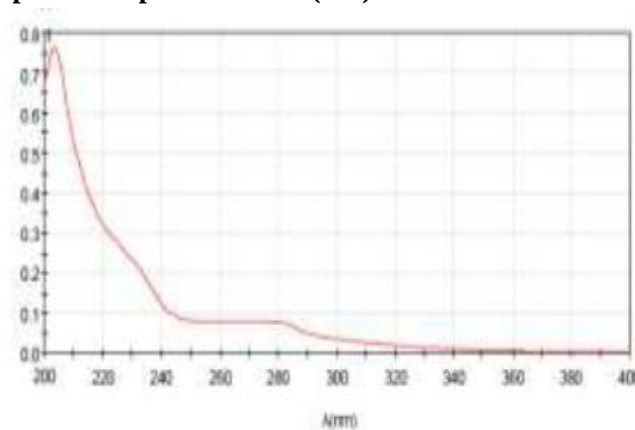
No	Perbandingan Eluen		Rf	Penampakan Noda Pereaksi LB
	Heksana	Etil asetat		
1	9,5	0,5	0,2	1 noda ungu
2	9	1	0,45	1 noda ungu
3	8	2	0,75	1 noda ungu
4	7,5	2,5	0,825	1 noda ungu

3.4 Uji Titik Leleh

Uji ini dilakukan untuk melihat apakah senyawa triterpenoid sudah murni atau belum. Hasil uji titik

leleh didapatkan dengan rentang titik leleh sebesar 137-139 °C, sehingga senyawa dapat dikatakan murni dengan perbedaan titik lelehnya ≤ 2 °C [13].

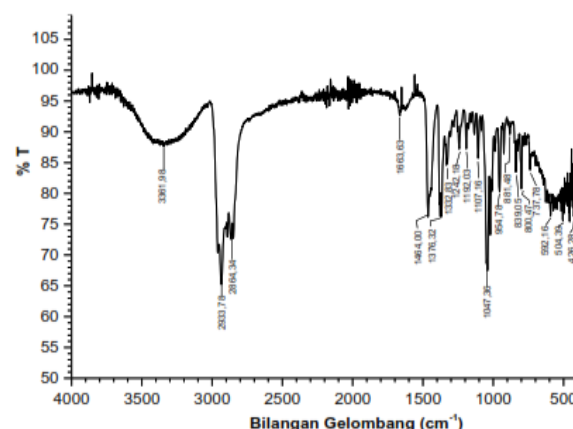
3.5 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi Spektroskopi Ultraviolet (UV)



Gambar 3. Spektrum UV senyawa hasil isolasi

Berdasarkan hasil pengukuran spektrum UV menunjukkan pita serapan maksimum pada panjang gelombang 203 nm. Pada panjang gelombang ini mengindikasikan terjadi transisi elektron $\pi-\pi^*$ yang menunjukkan adanya kromofor dari ikatan rangkap ($C=C$). Spektrum ini juga menunjukkan ciri khas dari senyawa triterpenoid yang muncul pada daerah UV dengan ditandai tidak adanya ikatan rangkap tidak berkonjugasi [14].

Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR)



Gambar 4. Spektrum FTIR senyawa hasil isolasi

Hasil spektrum inframerah menunjukkan adanya vibrasi ulur OH pada rentang bilangan 3200 cm^{-1} - 3500 cm^{-1} . Pita serapan pada bilangan gelombang 1047,36 cm^{-1} menandakan adanya vibrasi ulur C-O alkohol. Pada bilangan gelombang 1663,63 cm^{-1}

menandakan vibrasi ulur C=C alkena. Munculnya vibrasi ulur gugus C-H alkana pada bilangan gelombang $2933,78\text{ cm}^{-1}$ dan $2864,34\text{ cm}^{-1}$ yang diperkuat dengan adanya vibrasi tekuk C-H dari CH_2 pada bilangan gelombang $1464,00\text{ cm}^{-1}$ dan tekukan C-H dari CH_3 pada bilangan gelombang $1376,23\text{ cm}^{-1}$ yang merupakan geminal dimetil serapan khas dari senyawa triterpenoid [15].

3.6 Uji Sitotoksik

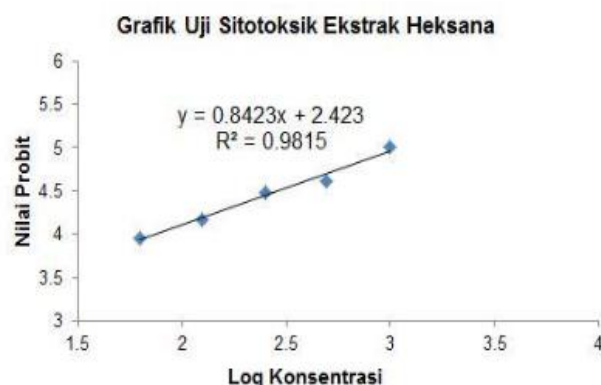
Hasil uji sitotoksik ini dilihat dari kematian larva udang *Artimia salina* dicantumkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengamatan uji sitotoksik ekstrak heksana, etil asetat dan metanol daun salam (*Syzygium polyanthum*)

Ekstrak	Konsentrasi (µg/mL)	Persen Kematian (%)	Nilai Probit	log c	Regresi	LC ₅₀ (mg/L)
Heksana	62,5	15	3,96	1,7959	$y = 0,8423x + 2,423$	1148,15
	125	20	4,16	2,0969		
	250	30	4,48	2,3979		
	500	35	4,61	2,6939		
	1000	50	5,00	3		
Etil Asetat	62,5	20	4,16	1,7959	$y = 0,7752x + 2,8958$	316,23
	125	35	4,61	2,0969		
	250	45	4,87	2,3979		
	500	50	5,00	2,6939		
	1000	55	5,13	3		
Metanol	62,5	25	4,33	1,7959	$y = 1,2179x + 2,1167$	234,42
	125	40	4,75	2,0969		
	250	45	4,87	2,3979		
	500	65	5,39	2,6939		
	1000	80	5,84	3		

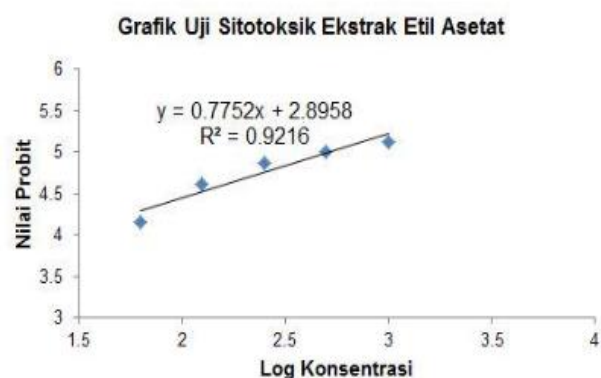
Pengujian dilakukan terhadap masing-masing ekstrak heksana, etil asetat dan metanol daun salam [16]. Persentase kematian larva udang pada berbagai variasi konsentrasi dikonversikan menjadi nilai probit dengan menggunakan tabel nilai probit sesuai persentase kematian. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa konsentrasi larutan sebanding dengan jumlah larva udang yang mati. Pada masing-masing ekstrak menunjukkan jumlah kematian udang yang berbeda-beda. Hal ini dapat dilihat dari nilai LC₅₀ masing-masing ekstrak. Nilai LC₅₀ dihitung berdasarkan nilai persamaan regresi antara log konsentrasi dengan nilai probit. Berdasarkan literatur, dijelaskan bahwa tingkat toksisitas suatu senyawa dikatakan tidak toksik jika nilai LC₅₀ > 1000 mg/L, jika nilai LC₅₀ kisaran 30- 1000 mg/L dikatakan

mempunyai sifat toksik kuat sedangkan nilai LC₅₀ < 30 mg/L dikatakan mempunyai sifat toksik sangat kuat. Kurva toksisitas pada masing-masing ekstrak dapat dilihat pada gambar 4.1, gambar 4.2 dan gambar 4.3.



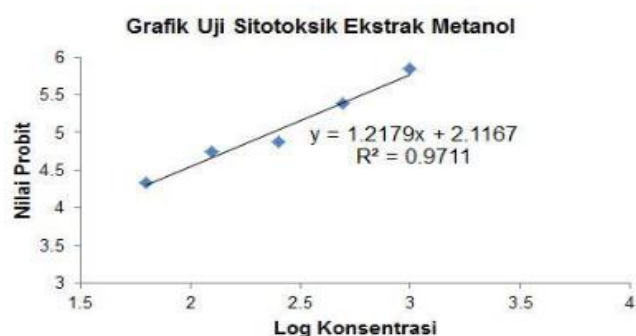
Gambar 5. Kurva regresi penentuan nilai LC₅₀ pada ekstrak heksana

Pada Gambar 5 dapat dilihat terjadi peningkatan kematian berdasarkan kenaikan konsentrasi. Setelah didapat persamaan regresi pada ekstrak heksana, dapat dihitung nilai LC₅₀. Dari hasil ini diperoleh nilai LC₅₀ ekstrak heksana yaitu 1148,15 mg/L. Berdasarkan literatur, dijelaskan bahwa tingkat toksisitas suatu senyawa dikatakan tidak toksik jika nilai LC₅₀ > 1000 mg/L. Sehingga aktivitas sitotoksik pada ekstrak heksana bersifat lemah karena memiliki LC₅₀ lebih dari 1000 mg/L.



Gambar 6. Kurva regresi penentuan nilai LC₅₀ pada ekstrak etil asetat

Berdasarkan Gambar 6 diperoleh nilai LC₅₀ ekstrak etil asetat yaitu 316,23 mg/L. Berdasarkan literatur, dikatakan toksik jika nilai LC₅₀ 30-1000 mg/L dan dikatakan sangat toksik jika nilai LC₅₀ < 30 mg/L. Sehingga aktivitas sitotoksik pada ekstrak etil asetat bersifat kuat karena memiliki LC₅₀ pada kisaran 30- 1000 mg/.



Gambar 7. Kurva regresi penentuan nilai LC_{50} pada ekstrak metanol

Pada Gambar 7 didapat persamaan regresi pada ekstrak metanol, sehingga dapat dihitung nilai LC_{50} . Dari hasil ini diperoleh nilai LC_{50} ekstrak metanol yaitu 234,42 mg/L. Ini menunjukkan aktivitas sitotoksik pada ekstrak metanol bersifat kuat karena memiliki LC_{50} pada kisaran 30-1000 mg/L.

4. Kesimpulan

Senyawa hasil isolasi dari ekstrak etil asetat daun salam didapatkan senyawa triterpenoid berupa padatan putih kristal seberat 0,0188 g dengan rentang titik leleh 137-139 °C. Data karakteristik spektrum UV menunjukkan tidak adanya ikatan rangkap tidak berkonjugasi. Pada data karakteristik spektrum IR menunjukkan adanya gugus hidroksil, gugus karbonil, dan gugus geminal dimetil.

Aktivitas sitotoksik menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dan ekstrak metanol memiliki aktivitas sitotoksik yang kuat dengan nilai LC_{50} masing-masing sebesar 316,23 mg/L dan 234,42 mg/L, sedangkan ekstrak heksana bersifat lemah dengan nilai LC_{50} 1148,15 mg/L.

Ucapan Terima Kasih

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, peneliti ingin berterimakasih kepada Laboratorium Kimia bahan Alam, Departemen Kimia, Fakultas MIPA Universitas Andalas.

Kontribusi Penulis

Konseptualisasi: N.F

Kurasi data: N.F., A.S.

Analisis Formal: N.F., A.S, M.F

Investigasi: M.F., R.S

Metodologi: N.F

Visualisasi: N.F., A.S., M.F

Penulisan – draf asli: N.F., A.S.

Menulis-mengulas & menyunting: N.F., A.S., M.F., R.S

Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan dalam pengerjaan dan penulisan manuskrip ini.

Daftar Pustaka

1. Novira, P. P., Febrina, E. (2018). Tinjauan Aktivitas Farmakologi Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*)
2. Silalahi, M. (2017). *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. (Botani, Metabolit Sekunder dan Pemanfaatan). *Jurnal Dinamika Pendidikan*, 10(1), 187–202.
3. Harismah, K.; Chusniatun. (2016). Pemanfaatan Daun Salam (*Eugenia polyantha*) Sebagai Obat Herbal Dan Rempah Penyedap Makanan. *War. LPM* 2016, 19, 110–118.
4. Rizki, M. I.; Hariandja, E. M. (2016). Aktivitas Farmakologis, Senyawa Aktif, dan Mekanisme Kerja Daun Salam (*Syzygium polyanthum*). Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.
5. Kilis, T. N. I. M.; Karauwan, F. A.; Sambou, C. N.; Lengkey, Y. K. (2020). Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Salam *Syzygium polyanthum* Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biofarmasetikal Tropis*, 3(1), 46–53.
6. Ayni, R. (2020). Identifikasi Metabolit sekunder Dan Uji Antibakteri Dari Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp). Skripsi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengatahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.
7. Nurhamidah, H Nurdin, Y Manjang, A Dharma, and Suryati, (2018). Cytotoxic activity assay from leaves and fruit extracts of *Ficus aurata* (Miq.) using brine shrimp lethality test method. *IOP Conf Series: Journal of Physics: Conf. Series* 1116 (2018) 042028
8. Carballo, J. L. I.; Inda, Z. L. H. and Perez (2002). A Comparison between Two Brine Shrimp Assay to Detect in Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Product. *BMC Biotechnology*. 2002, 2, 17, 1–5.
9. Mayanti, T. Aneu Wahyuni, Indri Indriyani, Darwati, Tati Herlina, Unang Supratman. (2017). Senyawa-Senyawa Aromatik dari Ekstrak Daun dan Kulit Batang *Dysoxylum parasiticum* Serta Toksisitasnya Terhadap *Artemia salina*, *Chimica et Natura Acta* Vol. 5 No. 1: 26–30
10. Santoni, A. Sabariah, Efdi, M. (2015). Isolasi Dan Elusidasi Struktur Senyawa Triterpenoid

Dari Kulit Batang Ambacang (*Mangifera Foetida* L.) Serta Uji Brine Shrimp Letality Test (BSLT), Jurnal Riset Kimia Vol. 9 No.1

11.Ibrahim, S. (1998). Teknik Laboratorium Kimia Organik. Pasca Sarjana Universitas Andalas .

12. Efendi, M.; Syafrizayanti.; Sari, D. K.(2016). Isolasi dan Karakterisasi Terpenoid Serta Uji Antioksidan dari Ekstrak Kulit Batang Shorea singkawan. Chempublish .Journal 2016, 1, 64.

13. Suzery, M.; Gultom, M. C. B.(2013). Senyawa Hiptolida Dan Pektinolida Dalam Fraksi Diklorometana Dari Daun Hyptis Pectinata Poit. Journal Sains dan Matematika , 21 (32), 1–4.

14.Silverstein, RM.; Bessler, G.C.; Moril.(1989). Spektrometric Identification of OrganicCompound (Penyidikan Spektroskopi Senyawa Organik). Penerbit Erlangga, Jakarta .

15. Pretsch E, Buhlmann P, Badertscher M.(2009) Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data .Fourth, Revised and Enlarged Edition. Springer- Verlag Berlin Heidelberg . 13-404. 16(Wight.) Walp) , Suplemen Volume 16 Nomor 2 hal 288-297.