

**IDENTIFIKASI DAN UJI AKTIVITAS TOKSISITAS EKSTRAK  
n-HEKSANA DARI KULIT BATANG TUMBUHAN  
*Xylopiya malayana* Hook. f.et Thomson (ANNONACEAE)**

<sup>1</sup>Amenda A, <sup>2</sup>H.Y. Teruna & <sup>2</sup>Yuharmen

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Studi S1 Kimia

<sup>2</sup>Dosen bidang Kimia Organik Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Binawidya Pekanbaru, 28293, Indonesia

arvirano@gmail.com

**ABSTRACT**

The plant family of Annonaceae spreads out widely in Indonesia. This family is best known for its secondary metabolite resource. *Xylopiya malayana*, a species of Annonaceae can be found in Pekanbaru. The objective of this study was to isolate secondary metabolite from the stem bark. It has been carried out using maceration method with n-hexane as the solvent. Separation of the metabolites has been done using vacuum liquid chromatography (VLC) and column chromatography. Nine combined fractions were produced The extract subjected to VLC were obtained nine combined by VLC fraction 1 (Fg 1) to fraction 9 (Fg 9). Fg 2 was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) resulting 35 peaks of compounds. This fraction contained some important volatile oils such as *caryophyllene oxide* (7,40%), *3,4-dimethyl, 3-cyclohexen-1-carboxaldehyde* (4,98%), *valerenal* (15,49%), *2-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-butenal* (8,37%), *hexadecanoic acid* (4,31%) and *oleic acid* (8,14%). The result from toxicity test by BLST method of nine fractions showed only Fg 1 had high toxicity (LC<sub>50</sub> = 50,11 ppm).

Keywords : GC-MS, toxicity test, *Xylopiya malayana*.

**ABSTRAK**

Famili Annonaceae merupakan tanaman yang tersebar luas di Indonesia. Famili ini merupakan sumber metabolit sekunder. *Xylopiya malayana* adalah jenis tanaman dari famili Annonaceae dan ditemukan di daerah Pekanbaru. Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi kulit batang *Xylopiya malayana*. Metode yang digunakan adalah maserasi dengan n-heksana sebagai pelarut. Pemisahan metabolit dilakukan dengan cara kromatografi vakum cair (VLC) dan kromatografi kolom. Hasil pemisahan ekstrak dengan VLC didapatkan sembilan fraksi gabungan (Fg 1-Fg 9). Fg 2 dianalisis dengan menggunakan Kromatografi Gas dan Spektrometri Massa (GC-MS) yang menghasilkan 35 puncak senyawa. Fraksi ini mengandung beberapa minyak atsiri penting berupa *caryophyllene oxide* (7,40%), *3,4-dimethyl, 3-cyclohexen-1-carboxaldehyde* (4,98%),

*valerenal* (15,49%), *2-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-butenal* (8,37%), *hexadecanoic acid* (4,31%) dan *oleic acid* (8,14%). Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT dari Sembilan fraksi gabungan hanya menunjukkan Fg1 memiliki toksisitas yang tinggi dengan nilai  $LC_{50} = 50,11$  ppm.

Kata kunci : aktivitas toksisitas, GC-MS, *Xylopiya malayana*

## PENDAHULUAN

Alam tropis Indonesia dengan kekayaan sumber daya hayati yang beraneka ragam merupakan gudang bahan kimia alami yang tidak ternilai harganya. Di Indonesia bahan kimia alami ini dihasilkan oleh 99 % tumbuhan tropis. Tumbuhan tropis merupakan kelompok tumbuhan terbesar di muka bumi dan hidup di bawah kondisi lingkungan yang keras baik faktor iklim maupun gangguan dari herbivora, serangga dan hama penyakit. Oleh karena itu tumbuhan tropis mampu merekayasa beraneka ragam senyawa kimia yang mempunyai berbagai bioaktivitas yang menarik dan kemampuan ini dapat pula diartikan sebagai mekanisme pertahanan diri terhadap ancaman lingkungan. Dalam hal ini, tumbuh-tumbuhan dapat menghasilkan senyawa kimia alami yang bersifat insektisida, antifungal atau sitotoksik.

Senyawa kimia alami yang terkandung dalam tumbuhan berupa senyawa metabolit primer dan sekunder yang diperoleh melalui proses metabolisme. Senyawa metabolit primer meliputi polisakarida, protein, lemak dan asam nukleat, sedangkan senyawa metabolit sekunder terdiri dari alkaloid, terpenoid, piron, asetogenin, lignan, flavonoid dan poliketida. Keberadaan senyawa metabolit sekunder sangat tergantung pada jenis tumbuhan (Harborne, 1987).

Famili Annonaceae merupakan kelompok tanaman penghasil metabolit sekunder dengan aktivitas biologis yang menonjol sehingga famili tanaman ini banyak digunakan untuk pengobatan, pemberantasan hama dan lainnya (Rupprecht *et al.*, 1990). Tanaman famili Annonaceae juga mengandung beberapa senyawa asam karboksilat, diantaranya asam stearat, asam oleat, etil oleat, asam oktadekanoat, etil ester oktadekanoat, ester dioktilheksadioat, dan asam palmitat (Suirta *et al.*, 2007).

*Xylopiya malayana* merupakan salah satu tumbuhan dari Famili Annonaceae yang kandungan kimianya belum diketahui. *Xylopiya Malayana* tumbuh di sebagian wilayah Indonesia, khususnya di Sumatera (Provinsi Riau). Dari hasil uji pendahuluan ternyata kulit batang tumbuhan *Xylopiya malayana* positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, fenolik, dan saponin. Oleh sebab itu pada penelitian ini dilakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak *n*-heksana kulit batang tumbuhan *Xylopiya malayana*.

Diharapkan dari hasil penelitian ini diperoleh data yang baru dan lengkap, sehingga dari data kandungan senyawa kimia yang diperoleh dapat menunjang bidang farmakologi, kimia, biologi, kedokteran serta bidang-bidang lainnya yang berhubungan.

## METODE PENELITIAN

Tumbuhan *Xylopiya malayana* diambil di Arboretum Universitas Riau Pekanbaru, Provinsi Riau. Kulit batang tumbuhan tersebut terlebih dahulu dibersihkan lalu dikering anginkan dan dijaga agar tidak terkena sinar matahari secara langsung

sampai beratnya konstan, setelah kering kulit batang tumbuhan tersebut dihaluskan hingga diperoleh serbuk halus dan ditimbang sampai berat konstan kemudian siap untuk diekstraksi.

#### **a. Uji Fitokimia**

Uji fitokimia dilakukan dengan metode Simes *et al.*, (1995) untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yaitu flavonoid, fenolik, saponin, terpenoid dan steroid sedangkan uji alkaloid dilakukan dengan metode Culvenor-Fitzgerald (1963) yang terkandung dalam kulit batang tumbuhan *Xylopiya malayana*.

#### **b. Ekstraksi**

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, serbuk kulit batang *Xylopiya malayana* direndam di dalam bejana ekstraksi dengan pelarut *n*-heksan selama 48 jam pada suhu kamar, lalu diultrasonikasi dan disaring. Proses ekstraksi ini dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan dan maserat yang didapat diuapkan dari pelarutnya menggunakan alat *rotary evaporator*, sehingga didapat ekstrak total *n*-heksan dan ditimbang beratnya. Residu serbuk kulit batang *Xylopiya malayana* yang telah kering kembali di ekstraksi dengan pelarut metanol untuk mendapatkan senyawa yang lebih polar.

#### **c. Pemisahan dengan Kromatografi Vakum Cair**

Untuk memisahkan senyawa-senyawa yang ada dalam ekstrak dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom vakum cair. Kromatografi kolom vakum cair diisi dengan silika gel 60 GF<sub>254</sub> hingga mencapai ketinggian lebih kurang 10 cm. Pengisian kolom dilakukan dalam keadaan vakum, agar diperoleh kerapatan yang maksimum. Ekstrak yang akan difraksinasi dilakukan preadsorpsi terlebih dahulu. Selanjutnya dielusi dengan sistem gradien peningkatan kepolaran.

#### **d. Pengujian hasil pemisahan dengan KLT**

Fraksi-fraksi hasil pemisahan secara kromatografi vakum cair diuji dengan KLT. Plat KLT diberikan batas atas dan bawah, masing-masing 1 cm dari atas dan bawah plat. Setiap fraksi ditotolkan pada plat KLT sesuai dengan nomor yang telah diberikan. Selanjutnya dielusi sampai pada batas atas plat yang telah ditandai, kemudian plat diangkat. Tandai noda yang dihasilkan dengan pensil yang dibantu melihatnya dengan lampu UV atau pereaksi penampak noda. Noda yang memberikan  $R_f$  yang sama bisa digabungkan menjadi satu fraksi.

#### **e. Analisis Menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS)**

Analisis sampel menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS), dilakukan menggunakan GC-MS Shimadzu QP 2010 dengan panjang kolom 30 m, I.D 0,32 mm, ketebalan 0,25  $\mu$ m dan menggunakan detektor electron ionization (EI), dengan program temperatur dari 40oC sampai 240oC dengan gas Hidrogen sebagai fase gerak, sedangkan untuk tekanannya sebesar 49,7 kPa. Jumlah senyawa yang terdapat pada ekstrak ditunjukkan oleh jumlah puncak (*peak*) pada kromatogram, sedangkan nama atau jenis senyawa yang ada diinterpretasikan berdasarkan data spektra dari setiap puncak tersebut dengan metode pendekatan pustaka pada database (Pringgenis, 2010).

#### **f. Uji Aktivitas Toksisitas**

Uji aktivitas toksisitas menggunakan larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Pengujian dilakukan terhadap ekstrak total n-heksana dan fraksi dengan konsentrasi 1000, 100 dan 10 ppm. Sampel sebanyak 20 mg dilarutkan dalam 2 mL metanol (larutan induk, konsentrasi 10000 ppm), kemudian dari larutan induk dibuat konsentrasi yang berbeda 1000, 100 dan 10 ppm (masing-masing dibuat dalam 3 vial). Disiapkan vial yang sudah dikalibrasi 5 mL untuk masing-masing konsentrasi. Sampel dipipet ke dalam masing-masing vial sebanyak 0,5 mL, lalu pelarut diuapkan hingga mengering. Selanjutnya, ke dalam masing-masing vial ditambahkan 50 µL DMSO dan air laut sedikit. Sebanyak 10 ekor larva udang yang sudah disiapkan dimasukkan ke dalam vial tersebut dan ditambah air laut hingga batas kalibrasi 5 mL. Tingkat toksisitas diukur dengan cara menghitung jumlah larva udang yang masih hidup dalam selang waktu 24 jam. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan perlakuan yang sama untuk masing-masing konsentrasi. Data yang diperoleh dianalisis untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub> dengan metode kurva menggunakan tabel analisis probit (Harefa, 1987).

Untuk kontrol, sebanyak 50 µL DMSO dipipet dengan pipet mikro dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan air laut sedikit. Kemudian dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach dan ditambah air laut hingga batas kalibrasi 5 mL.

Untuk melihat pengaruh pemberian ekstrak kulit batang *Xylopiya malayana* terhadap larva *Artemia salina* dilakukan perhitungan statistik dengan Analisa Probit. Perhitungan ini dilakukan dengan membandingkan antara larva yang mati terhadap jumlah larva keseluruhan, sehingga diperoleh persen kematian.

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **a. Isolasi dan uji toksisitas ekstrak total n-heksana dari kulit batang tumbuhan *Xylopiya malayana*.**

Sebanyak 2,9 kg serbuk kering kulit batang *Xylopiya malayana* dimaserasi dengan n-heksana selama 48 jam. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan fraksi nonpolar dari sampel. Sebelum maserat disaring terlebih dahulu dilakukan ultrasonikasi selama 30 menit yang bertujuan untuk menambah kelarutan senyawa dalam pelarut yang digunakan. Tahap ini diulangi kembali hingga maserat dari sampel tidak berwarna lagi. Maserat yang sudah disaring dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak total n-heksana berwarna hijau pekat sebanyak ± 26,16 g.

Serbuk sisa perendaman dengan n-heksana dikeringkan dan kemudian dilakukan perendaman kembali dengan pelarut metanol sebanyak 5 kali pengulangan masing-masing selama 24 jam. Kemudian dilakukan ultrasonikasi dan *rotary evaporator*, diperoleh ekstrak kental metanol sebanyak 74,21 g yang berwarna coklat kehitaman

Pada ekstrak kental n-heksana dilakukan uji toksisitas, uji ini merupakan uji tahap awal. Tujuannya untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari ekstrak kental apakah memberikan aktivitas yang positif atau tidak. Dari hasil uji toksisitas tahap awal, diperoleh nilai LC<sub>50</sub> 158,49 ppm

Data hasil uji LC<sub>50</sub> ekstrak kental n-heksana *Xylopiya malayana* terhadap larva *Artemia salina* yang diolah dengan metode BSLT. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini dipilih karena mudah dilakukan, membutuhkan biaya dan jumlah materi yang sedikit, tekniknya mudah dipahami dan hasilnya dapat dipercaya (Meyer *et al.*, 1982). Uji ini merupakan uji tahap awal. Tujuannya untuk mengetahui aktivitas

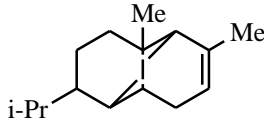
toksistas dari ekstrak kental apakah memberikan aktivitas yang positif atau tidak. Dari hasil uji toksistas tahap awal, diperoleh nilai  $LC_{50}$  158,49 ppm. Hal ini menunjukkan ekstrak kental *n*-heksana bersifat toksik terhadap larva *Artemia salina* dengan nilai  $LC_{50} \leq 500$  ppm.

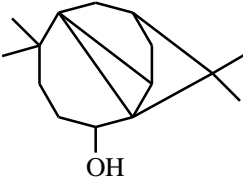
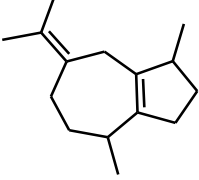
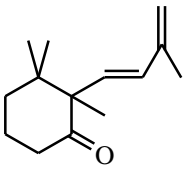
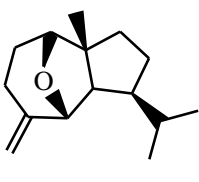
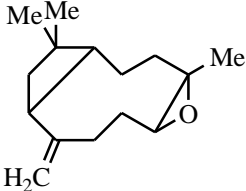
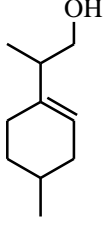
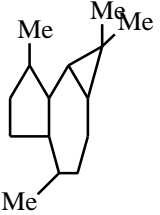
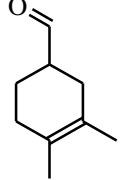
**b. Pemisahan ekstrak *n*-heksana dengan *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC) dan Analisis *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS)**

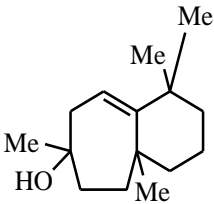
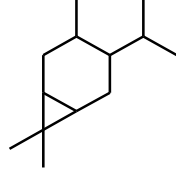
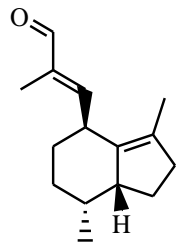
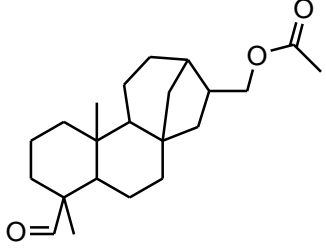
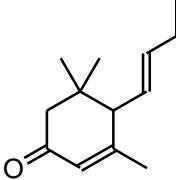
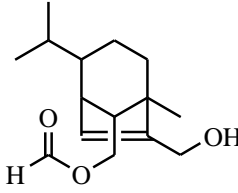
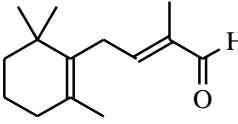
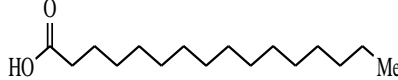
Ekstrak kental *n*-heksana diperoleh sebanyak 26,16 g. Sebanyak 20 g ekstrak dilakukan fraksinasi dengan menggunakan kromatografi kolom vakum cair (VLC) untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Pemisahan dilakukan dengan meningkatkan kepolaran eluen secara bertahap (sistem gradien elusi). Pemisahan dengan VLC menghasilkan 21 vial, masing-masing fraksi kemudian diuji dengan KLT. Fraksi yang menunjukkan noda dan  $R_f$  yang sama kemudian digabung menjadi fraksi gabungan yaitu Fg 1, Fg 2, Fg 3, Fg 4, Fg 5, Fg 6, Fg 7, Fg 8 dan Fg 9. Fraksi gabungan ini kemudian diuji KLT kembali dan disemprot dengan reagen anisaldehyd. Dari 9 fraksi gabungan terlihat pada hasil KLT yang telah disemprot dengan reagen anisaldehyd perubahan warna menjadi keunguan yang menandakan Fg 2 termasuk golongan terpenoid yang didapat berupa minyak atsiri yang berwarna kuning muda dan memiliki bau yang khas, kemudian dilakukan analisis dengan GC-MS untuk menentukan komponen dalam minyak atsiri Fg 2.

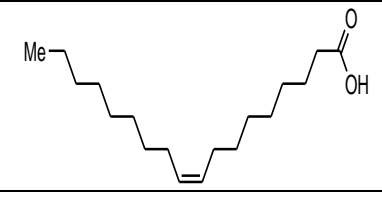
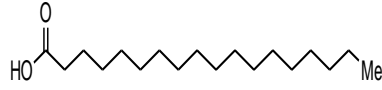
Hasil analisis GC-MS dari Fg 2 menunjukkan komponen-komponen yang ada pada minyak atsiri Fg 2 ditunjukkan pada Lampiran 8. Secara keseluruhan terdapat 35 puncak dan teridentifikasi 19 komponen senyawa. Senyawa yang teridentifikasi tersebut berdasarkan dengan *The National Institute of Standard and Technology database* (NIST) dan *WILEY 7.LIB* yang sudah terintegrasi dalam instrumen GC-MS. Hasil analisis menunjukkan bahwa Fg 2 memiliki 6 senyawa dominan penyusun minyak atsiri yang berupa senyawa golongan terpenoid, aldehid dan asam lemak. Pada puncak 14 (7,40%) teridentifikasi *caryophyllene oxide* yang merupakan senyawa golongan seskuiterpenoid, puncak 17 (4,98%) teridentifikasi senyawa *3,4-dimethyl, 3-cyclohexen-1-carboxaldehyde* yang merupakan golongan senyawa monoterpenoid, puncak 20 (15,49%) teridentifikasi senyawa *valerenal* yang merupakan golongan senyawa seskuiterpenoid, puncak 29 (8,37%) teridentifikasi senyawa *2-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)- 2-butenal* yang merupakan golongan senyawa aldehid, puncak 30 (4,31%) teridentifikasi senyawa *hexadecanoic acid* dan puncak 32 (8,14%) teridentifikasi senyawa *oleic acid* yang merupakan golongan senyawa asam lemak

Tabel 1: Analisis Senyawa dalam Minyak Atsiri Fg 2 dengan GC-MS.

Puncak	Waktu Retensi	Area Puncak	Persentase (%)	Nama Senyawa	Struktur senyawa
3	12,08	8358950	1,46	<i>α-Copaene</i>	

5	12,48	15863811	2,77	4,4,11,11-tetramethyl-7-Tetracyclo [6.2.1.0(3.8)0(3.9)] undecanol	
10	13,91	9788058	1,71	1,4-dimethyl-7-(1-methylethylidene)-1,2,3,4,5,6,7,8-octahydroazulene	
12	14,35	7543605	1,32	2,3,3-Trimethyl-2-(3-methyl-buta-1,3-dienyl)-cyclohexanone	
13	14,53	12181837	2,13	1,5-epoxysalvial-4(14)-ene	
14	14,71	42332752	7,40	(-)-Caryophyllene oxide	
15	14,83	88845318	1,55	p-Menth-3-en-9-ol	
16	14,94	28501871	3,82	Ledane	
17	15,04	28501871	4,98	3,4-dimethyl-Cyclohexen-1-carboxaldehyde-	

18	15,54	15045697	2,63	<i>Widdrol</i>	
19	15,62	16971189	2,97	<i>(+)-4-isopropenyl-3-Carene</i>	
20	15,78	88645266	15,49	<i>Valerenal</i>	
21	15,88	9772991	1,71	<i>17-(acetyloxy)-(4-β)-Kauran-18-al</i>	
22	16,06	19958257	3,49	<i>Megastigmatrienone</i>	
23	16,15	7684928	1,34	<i>(7-hydroxymethyl)-4-isopropyl-1-methyl bicyclo[3.2.1]oct-6-en-8-yl-methyl formiate</i>	
29	17,48	47915709	8,37	<i>2-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)- 2-Butenal</i>	
30	18,79	24680474	4,31	<i>Hexadecanoic acid</i>	

32	20,47	46604072	8,14	<i>Oleic acid</i>	
33	20,67	13564698	2,37	<i>Octadecanoic acid</i>	

### c. Aktivitas toksisitas hasil pemisahan ekstrak n-heksana dengan uji BSLT

Uji toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini dipilih karena mudah dilakukan, membutuhkan biaya dan jumlah materi yang sedikit, tekniknya mudah dipahami dan hasilnya dapat dipercaya (Meyer *et al*, 1982).

Uji toksisitas yang dilakukan dengan metode *Brine Shrimps Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva *Atemia salina* Leach sebagai hewan uji untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari fraksi hasil VLC. Pada 9 fraksi gabungan hasil *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC) dilakukan uji toksisitas, uji ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas toksisitas dari 9 fraksi. Perhitungan  $LC_{50}$  dengan metode kurva menggunakan tabel probit diperoleh hasil yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2: Hasil uji toksisitas Fg 1 – Fg 9

No.	Sampel	$LC_{50}$ (ppm)
1.	Fr 1 (Fg 1)	50,11
2.	Fr 2 (Fg 2)	707,94
3.	Fr 3-4 (Fg 3)	7943
4.	Fr 5 (Fg 4)	1778,3
5.	Fr 6-8 (Fg 5)	1000
6.	Fr 9-10 (Fg 6)	-
7.	Fr 11-12 (Fg 7)	14454
8.	Fr 13-14 (Fg 8)	7943
9.	Fr 15-21 (Fg 9)	7413

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh Fg 1 memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 50,11 ppm, Fg 2, Fg 3, Fg 4, Fg 5, Fg 6, Fg 7, Fg 8 dan Fg 9 memiliki nilai  $LC_{50} > 1000$  ppm. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi 1 (Fg 1) mempunyai sifat sangat toksik dan Fg 2, Fg 3, Fg 4, Fg 5, Fg 6, Fg 7, Fg 8 dan Fg 9 tidak bersifat toksik terhadap uji kematian larva udang, karena suatu sampel dianggap toksik terhadap uji kematian larva udang jika konsentrasi maksimum 1000 ppm dengan  $LC_{50} \leq 500$  ppm (Zetra & Parasetya, 2007)



## KESIMPULAN

Fraksi gabungan 2 (Fg 2) dari hasil pemisahan kromatografi vakum cair menghasilkan minyak atsiri berupa cairan berwarna kuning pucat dan mempunyai bau yang khas sebanyak  $\pm 4,6$  g yang terdiri dari golongan senyawa monoterpenoid, seskuiterpenoid, aldehid dan asam lemak Hasil uji toksisitas terhadap sembilan fraksi gabungan hasil pemisahan dengan VLC menunjukkan bahwa fraksi 1 (Fg 1) mempunyai sifat toksik dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 50,11 ppm, sedangkan Fg 2, Fg 3, Fg 4, Fg 5, Fg 6, Fg 7, Fg 8 dan Fg 9 tidak bersifat toksik terhadap uji kematian larva udang, karena suatu sampel dianggap toksik terhadap uji kematian larva udang jika konsentrasi maksimum 1000 ppm dengan  $LC_{50} \leq 500$  ppm (Zetra & Parasetya, 2007).

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pembimbing penelitian Bapak Dr. Hilwan Yuda Teruna, M.Sc, Apt dan Drs. Yuharmen, M.Si beserta seluruh pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Culvenor, C. C. J dan Fitzgerald, J. S. 1963. *A Field Method for Alkaloid screening of Plant. J. Pharm Sci*, 52 : 303-304.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi ke-2. Penerbit ITB, Bandung.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobson, L.B., Nichol, D.E., dan McLaughlin, J.L. 1982. *Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents*. J. A Willey Interscience Publication. John Willey and Sons. New York.
- Pringgenis D. 2010. Karakteristik senyawa bioaktif bakteri *simbion molusca* dengan GC-MS. *Jurnal. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 2: 34-40.
- Rupprecht, J. K., Hua Hui, Y dan Mc Laughlin, J. L. 1990. *Annonaceous Acetogenins A Review, J. Nat. Prod.*, 53 (2) : 237-238
- Simes, J.J.H. 1995. *An Australian Phytochemical Survey*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Australia
- Suirta., Puspawati., dan Gumiaty., 2007. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Larvasida dari Biji Mimba (Azadirachta indica a. Juss) terhadap Larva Nyamuk Demam Berdarah (Aedes aegypti)*. FMIPA UU., Bali.
- Zetra, Y., & Parasetya, P. (2007). Isolasi Senyawa  $\alpha$ -Amirin dari Tumbuhan *Beilschmiedia roxburghiana* (Medang) dan Uji Bioaktivitasnya. *Akta Kimindo*, 3, 27-32.