

UJI AKTIVITAS SITOTOKSIK EKSTRAK DAN FRAKSI DARI SPON LAUT *Petrosia* sp. DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST*

Dian Handayani¹, Lendra Yunance², Krisyanella²

¹Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang

²Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang

Abstract

The determination of cytotoxic of the marine sponge *Petrosia* sp. using Brine Shrimp Lethality Test has been done. The cytotoxic activity analysis were done toward condensed extract, n-hexane, ethyl acetate and butanol fractions and yielded LC₅₀ value 70.736 ppm, 269.153 ppm, 197.38 ppm and 70.667 ppm respectively. It shown that butanol fraction was more cytotoxic than the other fractions.

Keyword: citotoxic activity, *Petrosia* sp., *Brine Shrimp Lethality Test*

Pendahuluan

Laut memiliki keanekaragaman organisme yang sangat besar sebagai sumber daya alam yang sangat potensial. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa organisme laut memiliki potensi yang sangat besar dalam menghasilkan senyawa-senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai bahan baku obat-obatan. Perkembangan dunia pengobatan dan ilmu pengetahuan yang semakin pesat memacu eksplorasi terhadap sumber senyawa bioaktif dari organisme laut.

Salah satu contoh organisme laut yang memiliki kandungan kimia yang menarik adalah spon dari filum Porifera. Spon diketahui dapat menghasilkan sejumlah produk laut yang bersifat alami dan mampu menunjukkan keseragaman senyawa kimia yang sangat besar. Senyawa-senyawa kimia yang mampu dihasilkannya antara lain alkaloid, terpenoid, steroid, fenolik dan lain-lain. Beberapa jenis spon yang memiliki bioaktivitas yang menarik seperti aktivitas antibakteri dari *Petrosia nigran* (Handayani *et al*, 2008), aktivitas antifungi dari *Stylissa flambeliformis* dan *Haliclona* sp (Setyowati *et al*, 2007), aktivitas antiinflamasi dari *Axinella brenstyli* (Yalcin, 2007), dan aktivitas sitotoksik dari *spongia* sp dan *petrosia* sp (Mayer & Gustafson, 2008).

Berdasarkan potensi bioaktivitas dari spon laut tersebut maka telah dilakukan skrining sitotoksik dari ekstrak kental metanol dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap 10 jenis spon yang diambil di perairan Mandeh Painan pada kedalaman ± 15 meter di bawah permukaan laut. Salah satu spon yang memiliki aktivitas sitotoksik adalah spon *Petrosia* sp sebesar 71,81 ppm. Hasil identifikasi dari museum Zoologi Amsterdam Belanda menyatakan sampel tersebut merupakan salah satu spesies dari genus *Petrosia*

sp dengan nomor koleksi MN 05. Aktivitas sitotoksik dari spon *Petrosia* sp tersebut cukup aktif dibandingkan dengan spon lainnya (Yulia, 2009).

Potensi sitotoksik yang dimiliki oleh *Petrosia* sp (MN 05) dapat digunakan sebagai sumber antikanker baru mengingat kanker masih merupakan penyakit penyebab kematian utama di dunia. Berbagai senyawa telah dikembangkan untuk melawan kanker, akan tetapi tak satupun jenis senyawa tersebut menghasilkan efek yang memuaskan dan tanpa efek samping yang merugikan. Usaha eksplorasi senyawa-senyawa antikanker terus dilakukan dengan sifat penghambatan yang lebih baik dan efek samping yang lebih rendah (Astuti, *et al.*, 2005).

Berdasarkan potensi sitotoksik dari *Petrosia* sp (MN 05) tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas sitotoksik fraksi aktif dengan menggunakan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil yang diperoleh dari penelitian ini dapat menambah wawasan, informasi dan kontribusi besar terhadap pengembangan sumber daya laut yang spesifik berasal dari Indonesia dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat obat antikanker unggulan.

Metoda Penelitian

Alat yang Digunakan

Seperangkat alat gelas, seperangkat alat *Rotary Evaporator* (Buchi®), corong pisah, timbangan listrik, vial, wadah pembiakan larva, airasi (pembentuk gelembung udara), dan pipet mikro (Hamilton®).

Bahan yang Digunakan

Petrosia sp, metanol, aquadest, kloroform, besi (III) klorida, norit, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, asam sulfat 2 N, asam klorida pekat, amoniak, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, *n*-heksana, etil asetat, butanol, air laut, dan dimetilsulfoksida (DMSO).

Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan larva *Artemia salina* L. Telur *Artemia salina* L. sebelumnya dibiakkan terlebih dahulu di dalam wadah biak yang berisi air laut yang dilengkapi airasi dan cahaya. Untuk penetasan sebaiknya pH larutan berada pada kisaran 7,5 – 8,5. Sedangkan temperatur untuk penetasan larva berkisar antara 25-30°C. Kemudian dibiarkan selama 48 jam sehingga akan terbentuk larva *Artemia salina* L.

Pengambilan Sampel Spon laut *Petrosia* sp

Sampel diambil pada tanggal 12 juni 2010, di perairan Painan sekitar Pulau Mandeh, Kecamatan Koto Sabaleh Tarusan, Kabupaten Pesisir Selatan, Sumatera Barat, pada kedalaman ±15 meter di bawah permukaan laut.

Pengujian Aktivitas Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Kental dengan Metoda *Brine Shrimp Lethality Test*

Pengujian pendahuluan terhadap aktivitas ekstrak kental dan fraksi dilakukan sebagai berikut: ekstrak kental dan fraksi ditimbang sebanyak 30 mg, kemudian dilarutkan dalam 3 ml metanol dan ini merupakan larutan induk sampel. Pengujian dilakukan dengan cara 3 variasi konsentrasi yaitu 1000 100 dan 10 ppm, dan setiap konsentrasi dibuat rangkap 3. Larutan uji dibuat dengan memipet

masing-masing 500, 50 dan 5 µl dari larutan induk, setelah itu larutan uji dimasukkan ke dalam desikator sampai semua pelarutnya menguap. Sebagai kontrol disiapkan 3 vial yang hanya diisi 50 µl larutan DMSO. Ekstrak yang sudah kering dari masing-masing vial dilarutkan dengan 50 µl DMSO, kemudian ditambahkan air laut 2 ml. Sebanyak 10 larva udang dimasukkan ke dalam vial tersebut, kemudian volume dicukupkan 5 ml dengan air laut. Jumlah larva yang hidup dihitung setelah 24 jam, maka dapat diketahui jumlah larva yang mati. Nilai LC_{50} dihitung dengan menggunakan metoda kurva.

Evaluasi data

1. Data dihitung dengan menggunakan persamaan regresi
2. Nilai LC_{50} dihitung dengan menggunakan metoda kurva

Hasil

Tabel 1. Data Pemeriksaan Organoleptis dari Spon Laut *Petrosia* sp

No	Karakteristik	Keterangan
1	Bentuk	Seperti batang yang bercabang-cabang
2	Warna	Coklat keunguan
3	Bau	Amis seperti bau ikan

Tabel 2. Data Berat Ekstrak dan Fraksi Setelah Diuapkan dengan *Rotary Evaporator*

No	Sampel	Berat (gram)
1	Ekstrak kental	36,1836
2	Fraksi <i>n</i> -heksana	1,623
3	Fraksi etil asetat	1,3
4	Fraksi butanol	15

Pembahasan

Sampel segar *Petrosia* sp ditiriskan sampai kering dan dicuci dengan menggunakan aquadest kemudian sampel ditiriskan kembali sampai kering. Sampel dimasukkan kedalam plastik dan diberi metanol sebagai pengawet. Kemudian sampel dilakukan identifikasi organoleptis seperti warna, bau dan bentuk. Spon *Petrosia* sp memiliki warna coklat keunguan, bau amis dan mempunyai bentuk seperti batang yang bercabang-cabang.

Selanjutnya dilakukan ekstraksi kandungan kimia dari spon laut *Petrosia* sp dimulai dengan cara merajang sampel dan ditimbang sebanyak 500 g. Penyarian sampel dilakukan dengan cara maserasi dengan merendam sampel dengan metanol selama 3-5 hari dan sesekali dikocok. Setelah 5 hari hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring. Ekstrak metanol yang diperoleh, diuapkan pelarutnya secara *in vacuo* dengan menggunakan *Rotary Evaporator*, sehingga akan didapatkan ekstrak kental yang didapatkan adalah sebanyak 36,1836 gram

Tabel 3. Hasil Pemeriksaan Pendahuluan Kandungan Kimia dari Ekstrak Kental

No	Kandungan kimia	Pereaksi	Pengamatan	Keterangan
1	Alkaloid	Mayer Dragendorrf	Tidak terbentuk endapan putih Tidak terbentuk endapan orange	negatif negatif
2	Terpenoid/steroid	Asam asetat anhidrat + H_2SO_4 p	Terbentuk warna merah	Positif
3	Saponin	Air/busa Minyak zaitun (emulsi)	Terbentuk Busa yang stabil ± 10 menit Terbentuk emulsi	positif positif
4	Fenolik	Besi (III) klorida $K_2Cr_2O_7$	Terbentuk warna biru tua Terbentuk endapan kuning	positif positif

Tabel 4. Hasil Pemeriksaan Pendahuluan Kandungan Kimia dari Fraksi Kental *n*-Heksana

No	Kandungan kimia	Pereaksi	Pengamatan	Keterangan
1	Alkaloid	Mayer Dragendorrf	Tidak terbentuk endapan putih Tidak terbentuk endapan orange	Negatif Negatif
2	Terpenoid/steroid	Asam asetat anhidrat + H_2SO_4 p	Terbentuk warna merah	Positif
3	Saponin	Air/busa Minyak zaitun (emulsi)	Tidak terbentuk busa yang stabil ± 10 menit Tidak terbentuk emulsi	Negatif Negatif
4	Fenolik	Besi (III) klorida $K_2Cr_2O_7$	Terbentuk warna biru tua Terbentuk endapan kuning	Positif Positif

Tabel 5. Hasil Pemeriksaan Pendahuluan Kandungan Kimia dari Fraksi Etil Asetat

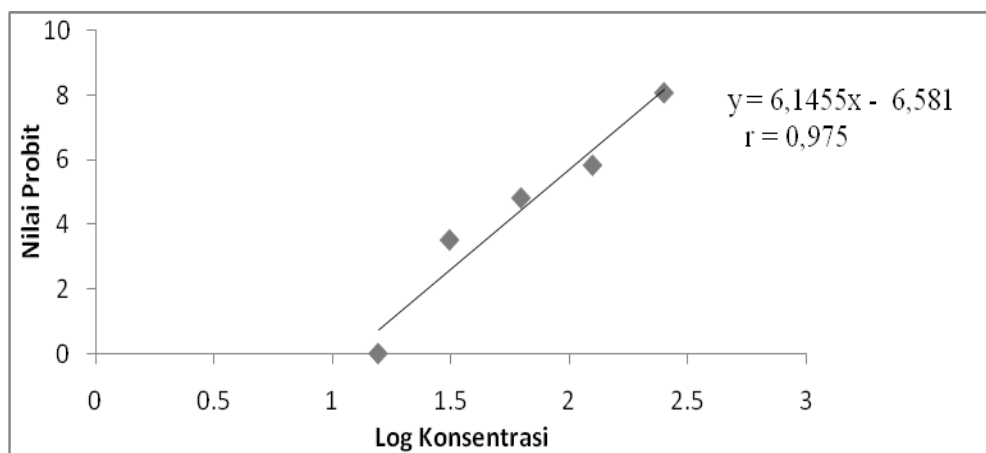
No	Kandungan kimia	Pereaksi	Pengamatan	Keterangan
1	Alkaloid	Mayer Dragendorrf	Tidak terbentuk endapan putih Tidak terbentuk endapan orange	Negatif Negatif
2	Terpenoid/steroid	Asam asetat anhidrat + H_2SO_4 p	Terbentuk warna merah	Positif
3	Saponin	Air/busa Minyak zaitun (emulsi)	Tidak terbentuk busa yang stabil ± 10 menit Tidak terbentuk emulsi	Negatif Negatif
4	Fenolik	Besi (III) klorida $K_2Cr_2O_7$	Tidak terbentuk endapan biru tua Tidak terbentuk endapan kuning	Negatif Negatif

Tabel 6. Hasil Pemeriksaan Pendahuluan Kandungan Kimia dari Fraksi Butanol

No	Kandungan kimia	Pereaksi	Pengamatan	Keterangan
1	Alkaloid	Mayer	Tidak terbentuk endapan putih	Negatif
		Dragendorff	Tidak terbentuk endapan orange	Negatif
2	Terpenoid/steroid	Asam asetat anhidrat + H_2SO_4 p	Terbentuk warna merah	Positif
3	Saponin	Air/busa	Terbentuk Busa yang stabil ± 10 menit	Positif
		Minyak zaitun (emulsi)	Terbentuk emulsi	Positif
4	Fenolik	Besi (III) klorida	Tidak terbentuk endapan biru tua	Negatif
		$K_2Cr_2O_7$	Tidak terbentuk endapan kuning	Negatif

Tabel 7. Hasil Pengujian Aktivitas Ekstrak Kental dengan Metoda *Brine Shrimp Lethality Test*

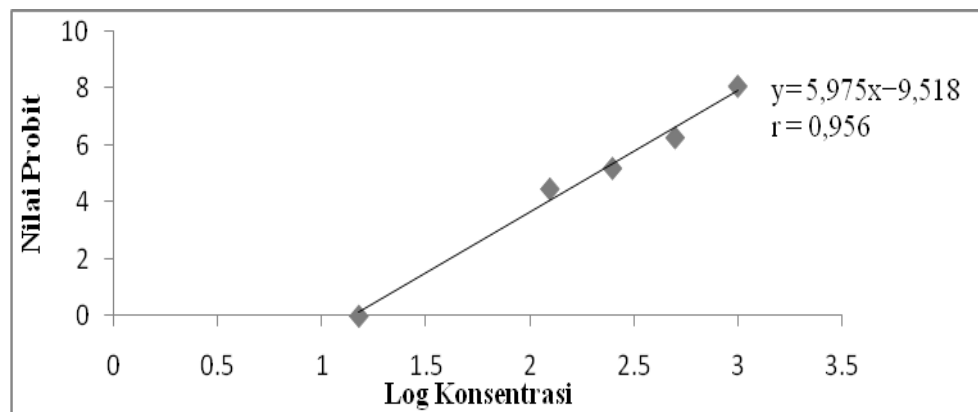
Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah Larva tiap kolompok	Hewan yang mati				% rata-rata kematian	Nilai Probit
			Vial			Rata-rata		
			1	2	3			
250	2,398	10	10	10	10	10	100	8,09
125	2,097	10	8	6	10	8	80	5,842
62,5	1,796	10	5	4	4	4,3	43	4,824
31,25	1,495	10	1	1	0	0,7	7	3,524
15,625	1,194	10	0	0	0	0	0	0
Kontrol (hanya DMSO 50 µl)	0	10	0	0	0	0	0	0



Gambar 1. Grafik Nilai Probit terhadap Log Konsentrasi dari Ekstrak Kental

Tabel 8. Pengujian Aktivitas Fraksi *n*-Heksana dengan Metoda *Brine Shrimp Lethality Test*

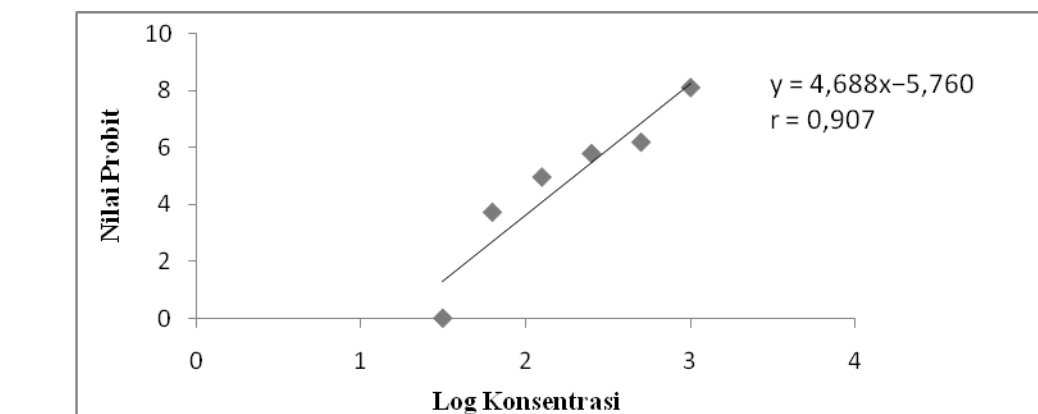
Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah Larva tiap kolompok	Hewan yang mati				% rata-rata kematian	Nilai Probit
			Vial			Rata-rata		
			1	2	3			
1000	3	10	10	10	10	10	100	8,09
500	2,699	10	9	8	10	9	90	6,282
250	2,398	10	5	6	6	5,7	57	5,202
125	2,097	10	2	3	4	3	30	4,476
625	1,796	10	0	0	0	0	0	0
Kontrol (hanya DMSO 50ul)	0	0	0	0	0	0	0	0



Gambar 2. Grafik Nilai Probit terhadap Log Konsentrasi dari Fraksi *n*-Heksana

Tabel 9. Pengujian Aktivitas Fraksi Etil Asetat dengan Metoda *Brine Shrimp Lethality Test*

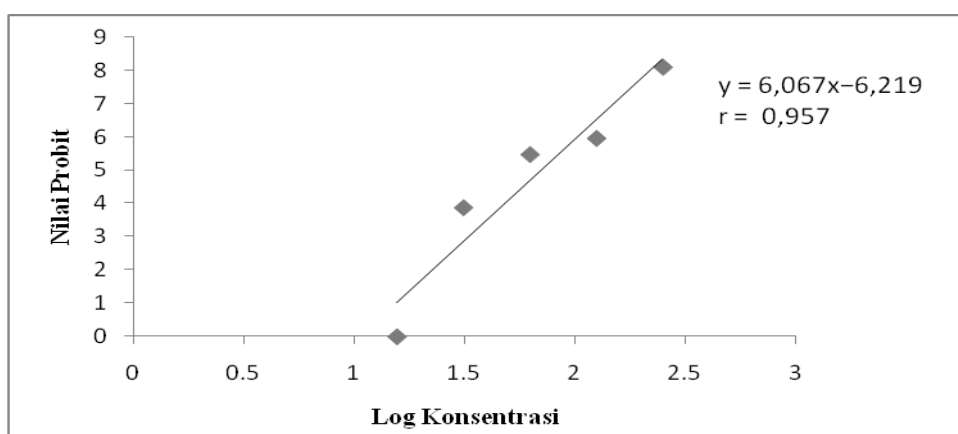
Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah Larva tiap kolompok	Hewan yang mati				% rata-rata kematian	Nilai Probit
			Vial			Rata-rata		
			1	2	3			
1000	3	10	10	10	10	10	100	8,09
500	2,699	10	8	9	9	8,7	87	6,175
250	2,398	10	7	8	8	7,7	77	5,772
125	2,097	10	4	4	3	3,7	37	4,950
62,5	1,796	10	1	2	0	1	10	3,718
31,25	1,495	10	0	0	0	0	0	0
Kontrol (hanya DMSO 50 µl)	0	10	0	0	0	0	0	0



Gambar 3. Grafik Nilai Probit terhadap Log Konsentrasi dari Fraksi Etil Asetat

Tabel 10. Pengujian Aktivitas Fraksi Butanol dengan Metoda *Brine Shrimp Lethality Test*

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Jumlah Larva tiap kolompok	Hewan yang mati				% rata- rata kematian	Nilai Probit
			Vial			Rata- rata		
			1	2	3			
250	2,398	10	10	10	10	10	100	8,09
125	2,097	10	8	9	8	8,3	83	5,954
62,5	1,796	10	5	6	6	5,7	57	5,468
31,25	1,495	10	1	2	1	1,3	13	3,874
15,25	1,194	10	0	0	0	0	0	0
Kontrol (hanya DMSO 50 µl)	0	10	0	0	0	0	0	0



Gambar 4. Grafik Nilai Probit terhadap Log Konsentrasi dari Fraksi Butanol

Kemudian dilakukan identifikasi kandungan metabolit sekunder terhadap ekstrak kental yaitu identifikasi alkaloid, fenolik, saponin terpenoid dan steroid. Dari identifikasi yang dilakukan didapatkan bahwa pada ekstrak kental mengandung saponin, fenolik dan terpenoid.

Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak kental dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang merupakan langkah awal dalam metoda pencarian senyawa antikanker pada spon laut *Petrosia* sp (MN 05). Pengujian ini bertujuan untuk menguji bahan-bahan aktif terhadap *Brine Shrimp*. Metoda ini menggunakan larva udang *Artemia salina* L. sebagai hewan percobaan. Telur *Artemia salina* L (Mc Laughlin, 1991; Meyer, 1982). Telur larva dibiakkan terlebih dahulu di dalam wadah biak yang berisi air laut yang dilengkapi airasi dan cahaya.

Pengujian aktivitas sitotoksik dari ekstrak kental dilakukan sebagai berikut: ekstrak kental ditimbang sebanyak 30 mg, kemudian dilarutkan dalam 3 ml metanol dan ini merupakan larutan induk sampel. Pengujian dilakukan dengan 3 variasi konsentrasi yaitu 1000 ppm, 100 ppm dan 10 ppm, dan setiap konsentrasi dibuat rangkap 3. Larutan uji dibuat dengan memipet masing-masing 500, 50 dan 5 μ l dari larutan induk sampel, setelah itu larutan uji dimasukkan dalam desikator sampai semua pelarutnya menguap. Pelarut harus menguap sempurna agar tidak mengganggu penentuan toksisitas. Sebagai kontrol disiapkan 3 vial yang hanya diisi 50 μ l larutan DMSO. Ekstrak yang sudah kering dari masing-masing vial dilarutkan dengan 50 μ l DMSO. Penambahan DMSO ke dalam larutan uji bertujuan untuk melarutkan ekstrak, fraksi ekstrak dan senyawa murni. DMSO yang ditambahkan adalah sebanyak 50 μ l karena diatas jumlah tersebut DMSO dapat menyebabkan kematian pada larva. Kemudian ditambahkan air laut 2 ml. Sebanyak 10 larva udang dimasukkan kedalam vial tersebut dan kemudian volumenya dicukupkan 5 ml dengan air laut. Jumlah larva yang hidup dihitung setelah 24 jam, maka dapat diketahui jumlah larva yang mati.

Ekstrak kental pada konsentrasi 1000 ppm dan 100 ppm membunuh larva udang sedangkan konsentrasi 10 ppm tidak membunuh larva udang. Oleh karena itu untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat maka konsentrasi ekstrak dijadikan ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm dan 15,625 ppm dengan persentase rata-rata kematian 100%, 80%, 43%, 7% dan 0%. Kemudian LC_{50} dihitung menggunakan metoda kurva yaitu dengan menentukan nilai log konsentrasi konsentrasi yang didapat terhadap nilai probit dari persentase rata-rata kematian larva. Dari

data tersebut dapat dibuat grafik garis lurus antara nilai log konsentrasi terhadap nilai probit. Berdasarkan hasil perhitungan aktivitas sitotoksik didapatkan nilai LC_{50} dari ekstrak kental *Petrosia* sp yaitu sebesar 76,736 ppm.

Berdasarkan hasil pengujian toksisitas ekstrak kental *Petrosia* sp tersebut, dapat dikatakan bahwa kandungan bioaktif ekstrak kental *Petrosia* sp berpotensi sebagai kandidat antikanker dan dapat dilakukan pengujian lebih lanjut karena nilai LC_{50} nya <1000 ppm.

Proses selanjutnya adalah fraksinasi. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya. Pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana, etil asetat dan butanol. Fraksi yang didapat dipekatkan *in vacuo* sehingga didapat ekstrak kental untuk setiap fraksi, hal ini bertujuan untuk mengetahui berat dari masing-masing fraksi. Selanjutnya pada masing-masing fraksi dilakukan identifikasi kandungan metabolit sekunder yang sama dengan identifikasi kandungan metabolit sekunder pada ekstrak kental. Dari pengujian yang dilakukan didapatkan hasil bahwa pada fraksi *n*-heksana mengandung terpenoid dan fenolik; pada fraksi etil asetat mengandung terpenoid dan pada fraksi butanol mengandung terpenoid dan saponin.

Kemudian masing-masing fraksi dilakukan pengujian aktivitas sitotoksik terhadap *Brine Shrimp*, pengujian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi mana yang paling aktif terhadap *Brine Shrimp*. Pengujian aktivitas sitotoksik dari fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi butanol sama dengan pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak kental. Pada fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi butanol pada konsentrasi 1000 ppm dan 100 ppm membunuh larva udang sedangkan konsentrasi 10 ppm tidak membunuh larva udang.

Oleh karena itu untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat maka konsentrasi fraksi diturunkan. Untuk fraksi *n*-heksana konsentrasi diturunkan menjadi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm dan 62,5 ppm sehingga didapatkan hasil persentase rata-rata kematian dengan dosis yang berurutan yaitu 90%, 57%, 30% dan 0%. Pada fraksi etil asetat konsentrasi diturunkan menjadi 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm 62,5 ppm dan 31,625 ppm dan didapatkan hasil persentase rata-rata kematian dengan dosis yang berurutan yaitu 87%, 77%, 47%, 10% dan 0%. Pada fraksi butanol konsentrasi diturunkan menjadi 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm dan 15,625 ppm, sehingga didapatkan hasil persentase rata-rata kematian dengan dosis yang berurutan yaitu 100%, 83%, 57%, 135 dan 0%.

Kemudian nilai LC_{50} dari masing-masing fraksi diatas yaitu fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi butanol dihitung menggunakan metoda kurva yaitu dengan menentukan nilai log konsentrasi dari konsentrasi yang didapat terhadap nilai probit dari persentase rata-rata kematian larva. Dari data tersebut akan didapatkan grafik garis lurus antara nilai log konsentrasi terhadap nilai probit dari persentase rata-rata kematian larva *Artemia salina* L.

Hasil pengujian toksisitas masing-masing fraksi dihitung dengan menggunakan metoda kurva dapat diketahui nilai LC_{50} dari fraksi *n*-heksana sebesar 269,153 ppm, nilai LC_{50} dari fraksi etil asetat sebesar 197,38 ppm dan nilai LC_{50} dari fraksi butanol sebesar 70,667 ppm. Untuk melihat perbandingan nilai LC_{50} dari ekstrak dan fraksi dapat dibuat histogram dari masing-masing nilai LC_{50} yang didapatkan. Nilai LC_{50} yang ditunjukkan oleh masing-masing fraksi <1000 ppm sehingga dapat dilakukan penelitian lebih lanjut.

Dari hasil diatas diketahui bahwa fraksi butanol memiliki nilai LC_{50} yang paling kecil yaitu 70,667 ppm (Lampiran 1, Tabel VIII; Gambar 3). Sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi butanol lebih aktif dan bersifat sitotoksik. Karena konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh larva *Artemia salina* L. lebih kecil dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat. Dimana senyawa yang mungkin bersifat sitotoksik adalah terpenoid dan saponin. Senyawa saponin mempunyai sifat dapat menghemolisis sel darah merah dan bersifat sangat toksik bila diinjeksikan ke dalam aliran darah. Sementara senyawa terpenoid dapat merusak DNA dengan cara merusak ikatan dalam DNA menjadi DNA *single-Strand* dan dapat menghambat proses mitosis sel (Sladic & Gasic, 2006)

Kesimpulan

1. Dari uji pendahuluan kandungan kimia dari spon laut *Petrosia* sp menunjukkan adanya kandungan senyawa terpenoid, fenolik dan saponin
2. Dari pengujian aktivitas sitotoksik ekstrak kental dengan metoda *Brine Shrimp Lethality Test* diketahui bahwa ekstrak kental aktif terhadap *Artemia salina* L.
3. Perhitungan nilai LC_{50} dengan menggunakan metoda kurva menunjukkan bahwa fraksi butanol yang lebih aktif terhadap larva udang *Artemia salina* L dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat yaitu 70,667 ppm

Daftar Pustaka

- Astuti, P. Alam., G. Hartati., M. S. Sari, D & Wahyono. S., 2005, Uji Sitotoksik Senyawa Alkaloid dari Spon Laut *Petrosia* sp Potensial Pengembangan Sebagai Antikanker, *Makalah Farmasi Indonesia*, 16 (1), 58-62
- Handayani, D., N. Sayuti dan Dachriyanus., 2008, Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epidioksida sterol dari Spon Laut *Petrosia nigrans*, Asal Sumatera Barat, Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II 17-18 November 2008, Lampung: Universitas Lampung
- Mc Laughlin, J. L., 1991, *Crown Gall Tumors on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher plant Screening and Fractionation, Method in plant Biochemistry*, Vol 6, San Diego: Academic Press, 1-32
- Mayer, A. M. S & K. R. Gustafson., 2008, Marine Pharmacology in 2005-2006: Antitumor and Cytotoxic Compound, *Science Direct*, 44, 2357-2387
- Meyer, B.N., N. R. Ferrigni., J. E. Putnam., L. B. Jacobsen., D. E. Nichols., and J. L. McLaughlin., 1982, *Brine Shrimp : a conventional general bioassay for active plant constituents*, *Planta Medica*, 45: 31-34
- Setyowati, E. P. Sudarsono dan Wahyono. S., 2005. Jaspamide : identifikasi Struktur Senyawa Sitotoksik dan Fungisida dari Spon *Styllissa Flambeliformis*, *Majalah Farmasi Indonesia*
- Sladic, D. And M. J. Gasic., 2006, Reactivity and Biological Activity of the Marine Sesquiterpene Hydroquinone Avarol and Related Compounds from Sponges of the Order *Dyctioceratida*, *Cheminform*, 37, 26:251
- Yalcin, F. N., 2007, Biological Activities of the Marine Sponge *Axinella*, Hacettepe University, 27, 47-60
- Yulia, M., 2009, Isolasi dan Uji Aktivitas Senyawa Sitotoksik dari Spon Laut *Petrosia* sp (ex Perairan Mandeh), (Skripsi), Sarjana Farmasi, Padang: Universitas Andalas