

UJI TOKSISITAS DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT) DAN IDENTIFIKASI KOMPONEN FITOKIMIA EKSTRAK ASETON KULIT BUAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.)

Dewi Chusniasih¹, Tutik¹

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Malahayati

chusniasih@gmail.com

Artikel Info

Diterima
tanggal
27.08.2020

Disetujui
publikasi
tanggal
30.10.2020

Kata kunci :
BSLT,
Fitokimia, Kulit
buah kakao
(*Theobroma
cacao* L);
Toksisitas

ABSTRAK

Uji toksisitas dan identifikasi komponen fitokimia ekstrak aseton kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) telah dilakukan. Sampel kulit buah kakao diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut aseton 80%, pengujian toksisitas dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), dan ekstrak dianalisis dengan metode Gas Chromatography – Mass Spectrofotometry (GC-MS). Ekstrak aseton kulit buah kakao bersifat toksik berdasarkan uji toksisitas dengan metode BSLT dengan nilai LC_{50} yaitu 24,69 ppm. Hasil analisis GC-MS diperoleh bahwa kandungan fitokimia ekstrak aseton kulit buah kakao didominasi oleh golongan asam lemak metil ester, yaitu sebanyak 15 senyawa dengan total persentase kelimpahan 93,94%. Senyawa dengan kelimpahan tertinggi yaitu n-asam heksadekanoat dengan luas area 31,02%, asam oleat dengan luas area 20,27%, dan asam oktadekanoat dengan luas area 12,24%.

ABSTRACT

Toxicity tests and identification of phytochemical components of acetone extract of cocoa pod (*Theobroma cacao* L.) were carried out. Samples of cocoa pods were extracted by maceration method with 80% acetone solvent, toxicity testing was carried out using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method, and extracts were analyzed using the Gas Chromatography - Mass Spectrofotometry (GC-MS) method. The acetone extract of cocoa pod husks is toxic based on the toxicity test with the BSLT method with an LC_{50} value of 24.69 ppm. From the results of GC-MS analysis, it was found that phytochemical content of the acetone extract of the cacao pods was dominated by the fatty acid methyl ester group, which was 15 compounds with a total abundance percentage of 93.94%. The compounds with the highest abundance were n-Hexadecanoic acid, Oleic acid, and Octadecanoic acid.

PENDAHULUAN

Buah kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan yang memiliki prospek cerah karena harganya relatif tinggi, mudah dipasarkan serta mempunyai arti ekonomi sebagai penghasil devisa negara. Di Indonesia terutama di Provinsi Lampung, tanaman kakao merupakan tanaman yang bernilai ekonomi sebagai komoditi ekspor. Masa depan

komoditi ini cukup cerah karena diperkirakan permintaan dunia terhadap komoditi ini akan terus meningkat. Namun hingga saat ini petani kakao hanya memanfaatkan bijinya saja, sedangkan kulit kakao tidak dimanfaatkan dan di buang begitu saja sebagai limbah. Seiring dengan peningkatan produksi kakao maka limbah yang dihasilkan akan semakin meningkat (Utama dkk, 2016).

Buah kakao berpotensi dikembangkan untuk pengobatan sebagai anti kanker karena kandungan senyawa fitokimianya. Kakao mengandung senyawa antioksidan dan antiradikal yang telah diuji secara invitro. Buah kakao mengandung beberapa senyawa fenolik yaitu katekin, epikatekin, antosianidin, proantosianidin, asam fenolik, dan beberapa flavonoid lainnya (Arlorio *et al.*, 2005). Menurut Figuera *et al.*, (1993), kulit buah kakao mengandung campuran flavonoid atau tannin terkondensasi atau terpolimerisasi, seperti antosianidin, katekin, dan leukoantosianidin. Kandungan flavonoid yang tinggi berkontribusi pada efek antioksidan, peningkatan imun, dan sifat antikanker (Elberry *et al.*, 2014). Kandungan flavonoid yang ada dalam limbah kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.) berpotensi sebagai antioksidan. Flavonoid juga dipercaya mengurangi resiko kanker, penyakit jantung, dan kencing manis karena mempunyai unsurunsur antikanker, antibakteria, antiviral, antialergi dan antiinflamasi (Manullang, 2010).

Komponen fitokimia pada tumbuhan merupakan senyawa bioaktif kimia yang diproduksi secara alami melalui jalur metabolisme primer atau metabolisme sekunder. Komponen fitokimia umumnya memiliki fungsi biologis bagi tumbuhan diantaranya mempertahankan serangan dari predator seperti serangga, jamur, gangguan kompetitornya, pelindung dari polusi, cekaman, bahkan kekeringan. Selain itu, kandungan fitokimia diharapkan dapat bermanfaat dalam kesehatan manusia atau melawan berbagai macam penyakit (Mathai, 2000).

Untuk mengetahui potensi suatu tanaman sebagai bahan antikanker, maka perlu dilakukan penelitian awal, yaitu uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk skrining senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Metode ini mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat (Meyer, *et al.*, 1982). Uji BSLT bertujuan menentukan suatu ekstrak memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan sel dan menjalani prosedur lebih lanjut dalam proses penemuan obat

antikanker (Kumar *et al.* 2013). Larva *Artemia salina* dianggap mewakili organisme zoologis untuk uji kematian secara *in vivo*. Hasil uji menunjukkan adanya korelasi positif dari sifat toksisitas senyawa uji terhadap hambatan proliferasi terhadap karsinoma nasofaring. Uji BSLT dilakukan dengan mengamati tingkat kematian yang ditimbulkan setelah diberi ekstrak terhadap larva udang jenis *A. salina* setelah diinkubasi selama 1x24 jam. Hasil yang diperoleh kemudian dihitung sebagai nilai LC_{50} (*Lethal Concentration*) ekstrak, dimana konsentrasi ekstrak yang dapat menyebabkan kematian *A. salina* sebanyak 50%.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menentukan toksisitas ekstrak aseton kulit buah kakao dengan menggunakan metode BSLT dan mengidentifikasi kandungan fitokimia ekstrak ekstrak aseton kulit buah kakao dengan menggunakan GC-MS.

METODE

Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven Memmert UN 5553L, rotary evaporator RV10 Digital, neraca analitik, blender, penangas air, dan simplisia kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.), aseton 80%.

Persiapan Sampel

Kulit buah kakao yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah yang sudah matang dan berwarna kekuningan. Bagian kulit buah kakao yang telah disortasi basah kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih dan dilakukan perajangan untuk mempermudah pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruangan hingga kering. Kulit kakao yang telah dikeringkan kemudian dibuat serbuk dengan menggunakan blender atau mesin penggiling. Kulit buah kakao diekstraksi dengan pelarut aseton 80% dengan metode maserasi. Ekstrak aseton dibuat dengan cara merendam 500 g simplisia dengan 2,5 L aseton 80% selama 24 jam dan sesekali diaduk. Ekstraksi dilakukan dengan pengulangan tiga kali dengan pelarut baru. Ekstrak yang dihasilkan kemudian disaring dan diuapkan pelarutnya menggunakan evaporator vakum pada suhu 40 °C.

Analisis GC-MS

Analisis kandungan fitokimia ekstrak menggunakan instrument *Gas Chromatography Mass Spectrofotometry* GC/MS (Shimadzu GCMS-QP2010). Helium digunakan sebagai carrier gas (0,85 mL/menit) dalam kolom kapiler Rtx-5MS (60 mm x 0.25 mm x 0.25 μ m) dan dioperasikan dengan mode electron impact (EI) pada 70 eV serta suhu sumber ion pada 200 °C. Kondisi kromatografi diatur pada 50°C untuk suhu oven kolom dan 280 °C. untuk suhu injeksi. Injeksi dilakukan dengan mode split, yaitu isothermal pada 50 °C selama 5 menit lalu ditingkatkan suhunya menjadi 280 °C selama 30 menit kemudian dipertahankan pada suhu ini hingga menit ke-60. Komponen senyawa aktif diidentifikasi berdasarkan waktu retensi dan analisis MS.

Pengujian Toksisitas dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT).

Skrining sitotoksisitas dilakukan berdasarkan metode McLaughlin *et al.* (1998) yang dimodifikasi. Penyiapan larva udang dilakukan dengan merendam 10 mg kista udang dalam toples kaca berisi 1 L air laut yang telah disaring agar menetas menjadi larva. Penetasan dilakukan dengan penerangan sinar lampu TL 14 watt dan diaerasi selama 24 jam pada suhu kamar. Larva udang digunakan untuk uji setelah berusia 48 jam. Larutan stok 2000 μ g/mL ekstrak etanol 96% dibuat dengan menambahkan 20 mg ekstrak dengan 50 μ L Tween80 lalu ditambahkan air laut hingga volumenya 10 mL. Ekstrak disonikasi hingga larut. Pengujian dilakukan dengan konsentrasi 1000, 500, 100, dan 10 μ g/mL. Pengujian toksisitas dilakukan dengan memasukkan 1 mL air laut yang berisi 10 ekor larva udang ke dalam mikropelat 12 sumuran dan ditambahkan 1000, 500, 100, dan 10 μ L larutan stok ekstrak (2000 μ g/mL). Volume setiap sumuran dicukupkan hingga 2 mL dengan penambahan air laut. Setiap konsentrasi ekstrak diuji sebanyak tiga kali ulangan. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar di bawah sinar lampu TL 14 watt selama 24 jam kemudian dihitung jumlah larva yang hidup. Kontrol dilakukan dengan prosedur yang sama tanpa penambahan ekstrak.

Analisis Data

Hasil pengujian toksisitas diperoleh nilai *Lethal Concentration* 50 (LC₅₀) yaitu konsentrasi yang dapat membunuh 50% larva udang. Nilai LC₅₀ diperoleh dengan analisis probit menggunakan *Software Package used for Statistical Analysis* (SPSS) 20.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Toksisitas Ekstrak Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Hasil pengujian toksisitas ekstrak aseton kulit buah kakao dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* disajikan pada tabel 1. Toksisitas ekstrak aseton kulit buah kakao ditunjukkan dalam nilai LC_{50} yaitu pada konsentrasi 24,69 ppm.

Tabel 1. Hasil analisis *brine shrimp lethality test* (BSLT) ekstrak aseton kulit buah kakao

Konsentrasi Ekstrak (ppm)	Akumulasi Mati	Mortalitas (%)	LC_{50} (ppm)
1000	10,00	100	24,69
500	9,30	93	
100	7,00	70	
10	4,00	40	

Pada penelitian ini dilakukan pengujian toksisitas ekstrak aseton kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L) dan analisis fitokimia ekstrak dengan menggunakan metode GC-MS. Sebelum dilakukan ekstraksi, sampel kulit buah kakao terlebih dahulu dirajang dan dikeringkan. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air yang ada di dalam sel sehingga dapat memudahkan proses penarikan senyawa kimia. Proses pengeringan harus terhindar dari sinar matahari secara langsung, hal ini disebabkan karena senyawa-senyawa yang terdapat di dalam sampel akan mengalami kerusakan akibat panas dan sinar yang bersumber dari sinar matahari secara langsung. Penyebab kerusakan senyawa metabolit sekunder termasuk alkaloid yaitu dapat disebabkan oleh radiasi sinar gamma, sinar UV-B dan sinar UV-C. Pengeringan akan lebih cepat dilakukan pada suhu tinggi, tetapi hal tersebut dapat mengakibatkan beberapa komponen mengalami kerusakan. Salah satu contoh yaitu alkaloid memiliki sifat kurang tahan terhadap panas (Yuniasih, 2016) serta penghalusan simplisia dapat mempermudah proses ekstraksi. Semakin kecil ukuran simplisia akan memperbesar luas permukaannya, sehingga interaksi antara pelarut dan zat terlarut akan semakin besar, dan prosesnya akan berjalan semakin efektif (Sarinastiti, 2018).

Metode yang digunakan untuk ekstraksi dalam penelitian ini adalah maserasi. Prinsip dari maserasi agar senyawa kimia yang memiliki sifat yang sama dengan pelarut akan tertarik dan terlarut ke dalam pelarutnya sehingga senyawa kimia tertentu dapat dipisahkan. Proses maserasi dilakukan dengan menimbang simplisia seberat 500 gram, lalu merendamnya menggunakan

wadah yang telah berisi aseton 80% sebanyak 4,5 liter selama 1 hari dan sesekali dilakukan pengadukan, setelah itu ekstrak diambil. Prosedur yang sama dilakukan sebanyak 3 kali. Ekstrak yang diperoleh dari perendaman tersebut dipekatkan dengan rotary evaporator, selanjutnya dilakukan pengovenan untuk menguapkan sisa pelarut sehingga diperoleh hasil akhir ekstrak kulit buah kakao dengan warna coklat kehitaman.

Alasan pemilihan metode maserasi karena metode ini tidak menggunakan pemanasan sehingga senyawa kimia yang bersifat termolabil yang akan diambil tidak terurai atau rusak. Alasan penggunaan pelarut aseton 80% yaitu aseton bersifat semi polar, sehingga mampu mengekstraksi senyawa ekstrak yang bersifat polar maupun sedikit non polar. Selain itu, aseton bersifat lebih selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang diinginkan, kapang dan khamir sulit tumbuh, mudah menguap dan mendapatkan ekstrak kental lebih cepat dibandingkan pelarut etanol 70% (Misna dan Diana, 2016).

Hasil uji toksisitas ekstrak aseton kulit buah kakao menunjukkan ekstrak dapat membunuh larva *Artemia salina* Leach dengan konsentrasi 1000, 500, 100, dan 10 ppm. Jumlah kematian larva *A. salina* Leach pada setiap konsentrasi uji ditunjukkan pada Tabel 2. Hasil pengujian toksisitas menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak aseton kulit buah kakao berbanding lurus dengan persentase kematian larva *A. salina*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin tinggi pula persentase kematian larva *A. salina*. Larva yang digunakan berumur 48 jam, karena pada umur ini anggota tubuh larva sudah lengkap.

Hasil analisis probit dengan menggunakan SPSS diperoleh nilai LC_{50} ekstrak aseton kulit buah kakao adalah 24,69 ppm. Berdasarkan Meyer *et al.*, (1982), suatu ekstrak menunjukkan aktivitas ketoksikan dalam uji toksisitas jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi <1000 ppm. Berdasarkan dari pernyataan tersebut maka ekstrak aseton kulit buah kakao bersifat toksik. Hal ini ditunjukkan dari nilai LC_{50} yang diperoleh <1000 ppm yaitu pada konsentrasi 24,69 ppm. Berdasarkan Kumar *et al.*, (2003), ada korelasi positif antara toksisitas ekstrak dengan daya antiproliferasi ekstrak terhadap sel kanker. Ekstrak aseton yang bersifat toksik berdasarkan uji BSLT berpotensi memiliki daya antiproliferasi terhadap sel kanker.

Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak

Hasil analisis GC-MS ekstrak aseton kulit buah kakao disajikan pada Tabel 2. Kandungan fitokimia ekstrak aseton kulit buah kakao didominasi oleh golongan asam lemak metil ester, yaitu sebanyak 15 senyawa dengan total persentase kemelimpahan sebesar 93,94%.

Tabel 2. Kandungan fitokimia golongan metil ester ekstrak aseton kulit buah kakao

No	Waktu Retensi (detik)	Nama Komponen	Kadar (%)
	7,495	Asam oktanoat, metil ester	0,55
2	13,814	Asam dekanat, metil ester	0,43
3	20,067	Asam undekanoat, 10-metil-, metil ester Asam dodekanoat, metil ester	2,88
4	21,266	Asam dodekanoat	0,30
5	25,766	Asam tridekanoat, 12-metil-, metil ester	1,74
6	26,789	Asam tetradekanoat	2,13
7	28,392	Asam pentadekanoat, metil ester Metil, 9-metiltetradekanoat	0,34
8	30,918	Asam heksadekanat, metil ester Asam pentadekanat, 14-metil-, metil ester	11,92
9	32,037	n-asam heksadekanat L-(+)-Asam askorbat 2,6-diheksadekanat	31,02
10	35,786	8,11-Asam oktadekadienoat, metil ester 9,12-Asam oktadekadienoat (Z,Z)-, metil ester	1,63
11	36,056	9-Asam oktadekanoat (Z)-, metil ester 9-Asam oktadekanoat (E)-, metil ester	3,38
12	37,109	Asam heptadekanoat, 15-metil-, metil ester Asam oktadekanoat, metil ester	3,36
13	37,534	9,12-Asam oktadekadienoat (Z,Z)-	3,75
14	37,827	Asam oleat	20,27
15	38,729	Oktadekanoat, 2-(2-hidroksietoksi) etil ester Asam oktadekanoat	12,24

Menurut Moreira *et al.*, (2018), buah kakao mengandung komponen alkohol, aldehid, keton, ester, dan terpenoid. Komponen golongan alkohol berperan sebagai pemberi aroma yang khas pada buah kakao. Analisis fitokimia ekstrak didominasi oleh golongan senyawa asam lemak dan ester. Golongan asam lemak metil ester diketahui memiliki banyak peranan dalam tubuh manusia. Golongan asam lemak tak jenuh seperti asam oktadekadienoat merupakan jenis asam

lemak esensial yang tidak disintesis oleh tubuh manusia (Roy *et al.*, 2018). Asam oktadekadienoat diketahui juga memiliki peran penting dalam pertumbuhan sel dengan berperan sebagai siklooksigenase-2 (COX-2) yang mengkatalisis biosintesis inhibitor prostaglandin (Roy *et al.*, 2018).

Asam lemak tak jenuh pada tubuh manusia diketahui memegang banyak peranan dalam kesehatan, termasuk dalam metabolisme kardiovaskular (Gillingham *et al.*, 2011). Menurut Hadley *et al.*, (2016), asam lemak banyak terdapat pada tumbuhan dan berperan penting dalam meningkatkan fungsi otak. Sebanyak 60% jaringan otak manusia tersusun atas golongan asam lemak. Asam lemak juga meregulasi metabolisme limfosit dan proliferasi yang menginduksi kematian sel T, serta meningkatkan mekanisme autoimun. Asam lemak juga berperan dalam mekanisme anti kanker (Simon *et al.*, 2009).

Asam heksadekanoat memiliki banyak bioaktivitas pada sel. Berdasarkan penelitian Panggua *et al.*, (2015), asam heksadekanoat bersifat sangat toksik pada pengujian toksisitas dengan metode BSLT dengan nilai LC_{50} pada konsentrasi 100 mg/ml. Berdasarkan Molyneux (2004), asam heksadekanoat atau asam palmitat termasuk dalam golongan asam karboksilat. Komponen asam heksadekanoat diketahui memiliki daya antibakteri dan antifungi (Johannes, 2008). Menurut Rusdy (2013), asam heksadekanoat dapat berperan sebagai senyawa antikanker dengan menginhibisi laju pembelahan dan pertumbuhan sel (efek mitosis). Berdasarkan nilai LC_{50} , ekstrak aseton bersifat toksik terhadap larva udang. Sifat toksisitas ekstrak dipengaruhi oleh peran kandungan fitokimianya, sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak aseton kulit buah kakao berpotensi sebagai bahan antiproliferasi terhadap sel kanker.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu ekstrak aseton kulit buah kakao bersifat toksik berdasarkan uji toksisitas dengan metode BSLT dengan nilai LC_{50} yaitu 24,69 ppm. Berdasarkan analisis fitokimia dengan metode GC-MS ekstrak aseton kulit buah kakao didominasi oleh golongan asam lemak metil ester, yaitu sebanyak 15 senyawa dengan total persentase kelimpahan sebesar 93,94%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi/ Badan Riset dan Inovasi Nasional Deputi Bidang Penguatan Riset dan Pengembangan atas bantuan dana penelitian pada skim Penelitian Dosen Pemula Tahun Pendanaan 2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Arlorio, M., Coisson, J.D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. 2005, Antioxidant and Biological Activity of Pigments from *Theobroma cacao* Hulls Extracted with Supercritical CO₂. <http://www.worldcocoaoundation.org/Library/Document/ArlorioPhenolicAntioxidan tsin CacaoHullsPhysiology.pdf>.
- Elberry A. A., Mufti, S., Al-Maghrabi. J., Sattar, E. A., Ghareib. A. S., Mosli, H. A., and Gabr, S. A., 2014, Immunomodulatory Effect of Red Onion (*Allium cepa* Linn) Scale Extract on Experimentally Induced Atypical Prostatic Hyperplasia in Wistar Rats. *Mediators of Inflammation*. (640746) : 1-13. Doi : 10.1155/2014/640746.
- Figueira, A., Janick. J., and BeMiller, J.N., 1993, *New products from Theobroma cacao: Seed pulp and pod gum*, Wiley, New York, p. 475-478.
- Gillingham, L.G., Harris-Janz, S., and Jones, J., 2011, Dietary Monounsaturated Fatty Acids are Protective against Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease Risk Factors, *Lipids*. 46: 209-228.
- Hadley KB, Ryan AS, Forsyth S, Gautier S, Salem N., 2016, The Essentiality of Arachidonic Acid in Infant Development, *Nutri* 8: 216.
- Johannes, E., 2008, Isolasi, Karakterisasi dan Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Dari Hydroid *Aglaophenia cupressina* Lamoureaux Sebagai Bahan Dasar Antimikroba, *Thesis Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin*. Makassar
- Mathai, K., 2000, *Nutrition in the Adult Years*. In *Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*, 10th Edition, ed.L.K. Mahan and S. Escott-Stump. ,271. 274-275.
- Manullang, L., 2010, Karakterisasi Simplisia, Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Kulit Umbi Bawang Merah (*Allii cepae* var. *Ascalonicum*) dengan metode uji brine shrimp (bst), Universitas Sumatera Utara Press, Medan
- McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE., 1998, The Use Of Biological Assays To Evaluate Botanicals, *Drug Inform Jl*. 32 : 513-524
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughin, J.L., 1982, Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent, *Planta Medica*. 45:31-34.
- Misna, M., Diana K., 2016, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Jurnal Farmasi Galenika*, Vol 2 No. 2.

- Molyneux, P., 2004, The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) Or Estimating Antioksidan Activity, *Songklanakarin J Sci Technol* Vol. 26,2,hal. 211-219.
- Moreira, I M., Vilela L.F., Santos C., Lima N., Schwan R.F., 2018, Volatile compounds and protein profiles analyses of fermented cocoa beans and chocolates from different hybrids cultivated in Brazil, *Food Research International* (109): 196-203
- Panggua, D.M., Johannes, E., Natsir, H., Litaay, M., 2015, Bioactivity and Antioxidant Test of Hexadecanoic Acid and β -Sitosterol Isolated from Hydroid *Aglaophenia Cupressina* Lamoureux, *International Journal of Engineering and Science Applications* Vol. 2 No. 2.
- Roy, A., Thakran N., Baradvaja N., 2018, Fatty Acid Methyl Ester Profile Analysis of In-Vitro Grown Accessions of *Plumbago zeylanica*, *Natural Product Chemistry and Research* Vol 6 No. 4.
- Rusdy, M., 2013, Aktivitas Uji Antimitotik Senyawa Asam Heksadekanoat Isolat dari Hydroid *Aglaophenia Cupressina* Lamoureux Pada Cleavage Bulu Babi *Tripneustes Gratilla* Linn, *Skripsi*, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Sarinastiti, N., 2018, Perbandingan Efektivitas Ekstrak Daun Dan Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) Sebagai Penghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro, *Skripsi*, Universitas Islam Negeri Raden Intan.
- Simon JA, Chen YH, Bent S., 2009, The relation of alpha-linolenic acid to the risk of prostate cancer: A Systematic review and meta-analysis., *Am J Clin Nutr* 89: 1558-1564.
- Utama GL, Kurnani TBA, Sunardi, Balia RL., 2016, Identification of ethanol fermenting yeasts from mozzarella cheese whey., *Int. J. on Adv. Sci. Eng. and Info. Tech.*, 6(2): 252-257.
- Yuniasih, M.M., 2018, Pengaruh Daya Hambat Antimikroba Isolat Alkaloid Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Candida albicans* Secara In Vitro, *Skripsi*. Universitas Sanata Dharma.