

Uji Toksisitas Ekstrak Daun Cassava Terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Rizki Budiyo Putri, WH Nugrahaningsih*, Nur Kusuma Dewi

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang
Jl. Raya Sekaran-Gunungpati, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50229
Email: nugrahaningsihwh@mail.unnes.ac.id

Diterima 7 Juni 2021

Disetujui 29 September 2021

ipublikasikan 31 Oktober 2021

Abstrak

Daun cassava (singkong; *Manihot esculenta*) merupakan salah satu bahan tanaman yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat herbal. Penelitian ini bertujuan mengetahui nilai LC₅₀ ekstrak aquades daun singkong yang diuji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach dengan metode brine shrimp lethality test (BSLT). Jenis penelitian experimental dengan Post Test-Only Grup Design. Populasi hewan uji pada penelitian ini adalah larva *Artemia salina* Leach. Sampel diambil dengan kriteria inklusi larva berusia 48 jam dan tidak tampak cacat secara anatomi, dan secara eksklusi menunjukkan aktivitas pergerakan sebelum perlakuan. Variabel bebas penelitian yaitu ekstrak daun singkong dengan konsentrasi 0 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml dan 10 µg/ml. Serta tingkat kematian larva *Artemia salina* Leach sebagai variabel tergantung. Data pada penelitian ini didapatkan dari jumlah larva udang yang mati 24 jam setelah perlakuan. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini, ditemukan 2 kematian pada kelompok perlakuan dosis 1 µg/ml, 1 kematian pada kelompok perlakuan dosis 2 µg/ml, 12 kematian pada kelompok perlakuan dosis 5 µg/ml, dan 3 kematian pada kelompok perlakuan dosis 10 µg/ml. Selanjutnya dari data kematian yang diperoleh dianalisis dengan analisis probit pada SPSS 21.0 for windows untuk dihitung nilai LC₅₀ nya. Setelah dianalisis pada SPSS diperoleh nilai LC₅₀ untuk ekstrak aquades daun singkong adalah sebesar 493,86 µg/ml.

Kata kunci: *Artemia salina* Leach, BSLT, Cassava, *Manihot esculenta*, toksisitas.

Abstract

Cassava (Manihot esculenta) leaf is one of plants potentially develop to medicinal herb. This research aimed to determine the LC₅₀ value of aquades extract of cassava leaf that was tested its toxicity toward Artemia salina Leach with Brine Shrimp lethality Test method. The type of this research was experimental research with Post Test-Only Design Group. The population of animal test in this research was larva Artemia salina Leach. The samples were taken with inclusion criteria of larva 48 hours old without anatomically defective and with exclusion criteria showed movement activity prior to the treatment. The independent variable of this research t was cassava leaf extract with concentration considered 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, and 10 µg/ml. While the death rate of Artemia salina Leach larvae was as dependent variable. The data in this research was obtained from the number of shrimp larvae that died in 24 hours after treatment. From the results, it was found 2 deaths in experimental grup with dose 1 µg/ml, 1 death in experimental grup with dose 2 µg/ml, 12 deaths in experimental grup with dose 5 µg/ml, and 3 deaths in experimental grup with dose 10 µg/ml. Furthermore, the death's data obtained was calculated by probit analysis on SPSS for windows 21.0 to find its LC₅₀ value. After analyzed on SPSS, it was obtained LC₅₀ value for aquades extract of cassava leaf of 493.86 µg/ml.

Key words: *Artemia salina* Leach, BSLT, Cassava, *Manihot esculenta*, toxicity.

How to cite:

Putri, R.B., Nugrahaningsih, W.H., & Dewi, N.K. (2021). Uji toksisitas ekstrak daun cassava terhadap larva artemia salina leach dengan metode *brine shrimp lethality test*. *Indonesian Journal of Mathematics and natural Sciences*, 44(2), 86-91

PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia telah mengenal pemanfaatan tanaman sebagai obat-obatan. Banyak macam tanaman obat telah diteliti kandungan kimia dan khasiatnya. Salah satu tanaman yang dikenal dan dimanfaatkan oleh masyarakat adalah tanaman cassava/singkong (*Manihot esculenta*). Daun Cassava dapat memiliki potensi sebagai antikanker (Sutiningsih *et al.*, 2020; Yusuf *et al.*, 2006), mempercepat penyembuhan luka (Angraini *et al.*, 2017; Megawati *et al.*, 2020; Sukmawati *et al.*, 2021), analgetik (Miladiyah *et al.*, 2011; Bokanisereme *et al.*, 2013), dan antibakteri (Mustarichie *et al.*, 2020).

Tanaman cassava (singkong) banyak tumbuh subur di berbagai wilayah Indonesia. Banyak varietas ditemukan di berbagai wilayah yang berbeda dari seluruh Indonesia. Bagian yang banyak dimanfaatkan pada cassava selain umbinya adalah daunnya. Daun cassava (*Manihot esculenta*) memiliki kandungan protein, vitamin C, flavonoid, saponin, tannin dan triterpenoid (Nisa *et al.*, 2013). Kandungan vitamin C nya lebih tinggi daripada sayuran lainnya, yaitu 275 mg per 100-gram daun singkong. Kadar proteinnya juga cukup tinggi. Daun singkong juga sebagai sumber vitamin A, setiap 100-gram mencapai 3.300 RE sehingga baik untuk kesehatan mata. Kandungan serat daun singkong juga tinggi sehingga dapat memperlancar buang air besar dan mencegah kanker usus serta penyakit jantung. Flavonoid pada daun cassava dapat berperan sebagai antimikroba. Triterpenoid berperan sebagai antifagus dan insektisida serta mempengaruhi sistem saraf manusia. Senyawa triterpenoid, saponin dan flavonoid diduga bersifat toksik pada kadar tertentu. Selain mengandung banyak metabolit yang berguna, daun cassava juga mengandung sianida dengan kadar rendah (Triana & Kamila, 2018). Asam sianida jika dikonsumsi dalam jumlah banyak dapat menyebabkan keracunan.

Sebelum menjadi suatu sediaan fitofarmaka atau obat herbal terstandar, setiap bahan alam harus melewati beberapa tahapan meliputi uji farmakologi eksperimental, uji toksisitas, uji praklinis, uji kualitas dan pengujian lain sesuai persyaratan yang berlaku demi menjamin keamanan masyarakat yang mengkonsumsinya. Uji toksisitas merupakan tahap awal penggunaan daun singkong sebagai obat atau suplemen untuk manusia. *Brine shrimp lethality test* (BSLT) adalah suatu metode pengujian dengan menggunakan hewan uji *Artemia salina* Leach. *Artemia salina* Leach digunakan sebagai hewan uji karena hewan ini merupakan *bioassay* pertama di alam yang mampu mendeteksi ketoksitas suatu bahan alam. *Artemia salina* Leach merupakan hewan uji standart yang digunakan pada uji toksisitas metode BSLT. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keamanan penggunaan ekstrak daun singkong sebagai obat untuk manusia dengan menghitung LC₅₀ menggunakan metode BSLT.

METODE

Ekstrak daun cassava

Tanaman singkong yang digunakan pada penelitian ini adalah singkong dari spesies *esculenta* varietas marsinah. Daun cassava dibuat ekstrak dengan pelarut akuades. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Biologi UNNES. Ekstrak daun cassava selanjutnya disiapkan dengan konsentrasi 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml, dan 10 µg/ml yang dilarutkan pada air laut. Air laut diperoleh dari Balai Besar Perikanan dan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara.

Metode *Brine Shrimp Lethality Test*

Uji BSLT dilakukan di Laboratorium Fisiologi Hewan Jurusan Biologi UNNES. Populasi hewan uji pada penelitian ini adalah larva *Artemia salina* Leach. Telur *Artemia salina* Leach diperoleh dari BBPBAP Jepara. Penetasan dan pemilihan telur *Artemia salina* Leach dilakukan dengan merendam telur artemia pada air laut dengan salinitas 30 ‰ di petri dish. Telur yang baik akan tenggelam dan yang kurang baik akan mengapung. Setelah 24 jam telur yang telah menetas dipindah pada petri yang berbeda agar tidak terjadi kerancuan umur larva. Larva diambil secara acak sebanyak 50 larva, kemudian dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing 10 larva dan ditempatkan pada flakon berisi 5ml air laut. Dengan cara yang sama, dibuat 5 kelompok pengulangan. Kelompok kontrol (K) tanpa diberi ekstrak, kelompok perlakuan 1 (Kp1) diberi 1 µg/ml ekstrak, Kp2 diberi 2 µg/ml ekstrak, Kp3 diberi 5 µg/ml ekstrak, dan Kp4 diberi 10 µg/ml ekstrak. Flakon ditempatkan pada suhu kamar dan tidak terkena sinar matahari langsung selama 24 jam. Setelah 24 jam dihitung larva yang mati pada setiap flakon dan dicatat pada tabel. Nilai LC₅₀ diperoleh dengan analisis probit menggunakan SPSS 21.0 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian uji toksisitas ekstrak akuades daun singkong terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT dilakukan dengan mengamati dan mencatat jumlah kematian larva setelah 24 jam pemberian ekstrak. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada tiap flakon digunakan untuk menghitung LC₅₀. Kematian larva *Artemia salina* merupakan respon alami sebagai bioassay yang pertama untuk penelitian keamanan penggunaan bahan alam. Jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada tiap flakon disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah Kematian *Artemia salina* Leach pada uji toksisitas ekstrak akuades daun singkong

Ulangan ke-	Mortalitas <i>Artemia salina</i> Leach (ekor)				
	Kontrol	Kp1 (1 µg/ml)	Kp2 (2 µg/ml)	Kp3 (5 µg/ml)	Kp4 (10 µg/ml)
1	0	0	0	3	0
2	0	1	0	3	2
3	0	0	1	2	0
4	0	1	0	3	0
5	0	0	0	1	1
Total	0	2	1	12	3
Rerata	0	0,4	0,2	2,4	0,6
Persentase	0%	4%	2%	24%	6%

Data pada Tabel 1 menunjukkan adanya kematian di semua kelompok perlakuan. Kematian terbanyak ditemukan pada kelompok perlakuan Kp3 yang diberi 5 µg/ml ekstrak akuades yaitu ada 12 kematian larva dari total 50 larva sampel yang diujikan atau tingkat kematiannya 24%. Untuk kelompok perlakuan ketiga yaitu dosis tertinggi 10 µg/ml ditemui 3 kematian dari 50 total larva yang diujikan atau tingkat kematiannya 6%. Hasil analisis probit menunjukkan nilai LC₅₀ dari ekstrak akuades daun singkong adalah sebesar 493,86 µg/ml.

Untuk memanfaatkan suatu hasil alam sebagai obat atau suplemen harus dilalui beberapa tahapan prosedural. Salah satunya uji toksisitas dengan metode *brine shrimp lethality test*. Daun singkong dipilih sebagai obyek penelitian karena daun singkong mudah ditemui di sekitar kita, harganya pun relatif murah daripada tanaman lain. Pengembangbiakan tanaman singkong juga relatif mudah dan perawatannya murah. Karena tanaman singkong lebih banyak dimanfaatkan umbinya, daun singkong menjadi bahan samping yang pemanfaatannya tidak lebih banyak daripada umbi singkong itu sendiri.

Uji toksisitas dengan BSLT merupakan cara yang paling mudah dan sederhana untuk meneliti toksisitas akut suatu senyawa, dengan cara menentukan nilai LC₅₀ dari komponen aktif suatu simplisia maupun bentuk sediaan ekstrak suatu tanaman. Apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut harga LC₅₀ dengan metode BST, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat. Namun, bila tidak bersifat toksik maka tanaman tersebut dapat diteliti kembali untuk mengetahui khasiat lainnya dengan menggunakan hewan coba lain yang lebih besar dari larva *Artemia salina* Leach seperti mencit dan tikus secara *in vivo*.

Suatu senyawa dinyatakan mempunyai potensi toksisitas akut jika mempunyai harga LC₅₀ kurang dari 1000 µg/ml. LC₅₀ (*Lethal Concentration 50*) merupakan konsentrasi zat yang menyebabkan terjadinya kematian pada 50% hewan percobaan. Hasil analisis probit dengan SPSS 21.0 menunjukkan nilai LC₅₀ ekstrak akuades daun singkong sebesar 493,86 µg/ml, sehingga dapat dikatakan ekstrak daun singkong memiliki potensi toksisitas akut menurut metode BST pada perlakuan hewan coba larva *Artemia salina* Leach. Nilai LC₅₀ yang diperoleh dari uji toksisitas metode BST ekstrak akuades daun singkong dapat dikatakan aman dan dapat digunakan sebagai obat atau suplemen di masa yang akan datang.

Jika dibandingkan dengan beberapa tanaman lain, nilai LC₅₀ ekstrak akuades daun singkong lebih tinggi daripada nilai LC₅₀ ekstrak tanaman patah tulang, namun lebih rendah dibandingkan anggur. Nilai LC₅₀ ekstrak daun singkong (493,86 µg/ml) memiliki tingkat keamanan yang lebih baik jika digunakan untuk obat dari pada kafein yang memiliki nilai LC₅₀ 306 (Meyer *et al.*, 1982). Ekstrak daun singkong lebih tinggi nilai LC₅₀ nya daripada kafein. Hal ini mungkin berhubungan dengan beberapa kandungan pada daun singkong, diantaranya kandungan beberapa metabolik sekunder serta sianida pada daun singkong. Nilai LC₅₀ ini berhubungan dengan kandungan dari daun singkong itu sendiri. Kandungan senyawa dalam daun singkong antara lain adalah flavonoid, triterpenoid,

saponin, tannin dan vitamin C (Nurdiana, 2013). Belum diketahui kandungan sianida dan kandungan lainnya masih utuh atau tidak setelah melalui proses ekstraksi.

Pada kadar tertentu kandungan pada ekstrak akuades daun singkong memiliki potensi toksisitas akut serta dapat menyebabkan kematian larva *Artemia salina* Leach. Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa metabolik sekunder seperti triterpenoid, saponin dan flavonoid dalam daun singkong yang dapat menghambat daya makan larva (*antifedant*). Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* (racun perut) (Rita *et al.*, 2008). Mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan larva diduga dengan cara menghambat transduksi sinyal ke inti melalui inhibisi protein kinase sehingga menghambat proliferasi dan pertumbuhan sel. Reseptor tirosin kinase berperan dalam meningkatkan pertumbuhan sel. Kandungan saponin bekerja dengan menginduksi *cell cycle arrest* dan apoptosis sel (Supriningrum *et al.*, 2016). Bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva, mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya dan larva mati kelaparan (Rita *et al.*, 2008).

Terkait dengan kandungan sianida pada daun singkong, mungkin tidak lebih banyak daripada umbi singkong. Juga belum diketahui apakah sianida masih atau hilang pada proses ekstraksi. Belum ada penelitian mengenai hal ini. Jika pada proses ekstraksi daun singkong ini hilang, maka toksisitas pada daun singkong berkaitan dengan kandungan lain pada daun singkong. Apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik, maka tanaman tersebut aman dan dapat dikembangkan sebagai obat. Sesuai penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa apabila suatu ekstrak tanaman memiliki nilai LC₅₀ >1000 dengan metode BST, maka tanaman tersebut aman dan dapat dikembangkan sebagai obat, maka daun singkong dapat dilanjutkan penelitiannya sebagai obat di masa yang akan datang (Mayer *et al.*, 1982).

Singkong memiliki lebih dari 100 varietas, dan yang digunakan pada penelitian ini adalah singkong dari spesies *esculenta* dan varietas *marsinah*. Varietas singkong ini paling banyak dimanfaatkan daunnya oleh masyarakat Indonesia, dan banyak ditemui tumbuh dengan baik di wilayah Jawa Tengah. Salah satu tanaman singkong spesies *Manihot rubricaulis* I.M. JOHNSTON dengan pelarut etanol yang memiliki nilai LC₅₀ lebih dari 1000. Hal ini menunjukkan bahwa setiap spesies singkong memiliki kandungan yang berbeda baik secara kualitas maupun kuantitasnya, serta tergantung juga pada pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi.

Berikut (Tabel 2) adalah beberapa nilai LC₅₀ tanaman yang banyak ditemui dan berpotensi untuk dijadikan obat, yang telah dipublikasikan sebelumnya. Dari nilai LC₅₀ beberapa tanaman tersebut (Tabel 2), nilai LC₅₀ ekstrak daun singkong berada lebih tinggi dari ekstrak daun patah tulang, namun lebih rendah dibanding ekstrak anggur dan buah pare. Nilai tersebut menunjukkan bahwa ekstrak akuades daun singkong dapat digunakan sebagai obat layaknya ekstrak patah tulang. Nilai keamanannya juga tidak jauh berbeda dari nilai LC₅₀ ekstrak anggur dengan pelarut etanol. Kemampuan ekstrak akuades daun singkong untuk membunuh larva *Artemia salina* termasuk dalam kategori *practically non-toxic*, karena konsentrasinya >100 µg/ml (Moshi *et al.*, 2010). Kategori *practically non-toxic* membuat ekstrak daun singkong tidak memiliki efek buruk pada penggunaannya karena tidak berada di kategori sangat toksik. Hal ini menunjukkan bahwa keamanan ekstrak daun singkong apabila digunakan sebagai obat atau suplemen.

Tabel 2. Nilai LC₅₀ Beberapa Tanaman

Tanaman	Pelarut	Nilai LC ₅₀	Peneliti
Buah Pandan	Etanol	0,25	Rizki Nifsi Ramdhini
Daun Soyogik	Metanol	35,4	Arter D. Muaja
Daun Sambiloto	Metanol	64,5	Lihardo Sinaga
Daun Pletekan	Etanol	142,16	Nurhawa Vitalia
Ranting Patah Tulang	Metanol	332,2489	Sandriani A. Aratmangun
Buah Anggur	Etanol	648,004	Dita Mutia
Buah Lakum	Alkohol 75%	172,38	Retno Praselia
Akar KB	Etanol	299,23	Risa Supriningrum
Buah Mahkota Dewa	Metanol	0,16	Vivi Lisdawati
Buah Pare	Etanol	519,226	Robby Cahyadi

Uji toksisitas dapat digunakan untuk melakukan skrining jenis tanaman yang berpotensi sebagai antikanker. Pemanfaatan bahan alam untuk dijadikan antikanker dibutuhkan nilai LC₅₀ yang rendah, karena semakin toksik maka semakin baik untuk mengobati kanker. Nilai LC₅₀ ekstrak daun singkong tidak menunjukkan potensinya sebagai antikanker. Namun ada beberapa penelitian yang menyatakan bahwa ekstrak daun singkong dapat menurunkan viabilitas sel Raji (Sutiningsih *et al.*, 2020).

Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah akuades, karena dari penelitian ini diharapkan ekstrak daun singkong dapat dijadikan obat atau suplemen bagi manusia. Jika menggunakan pelarut yang lain dikhawatirkan akan terganjal untuk mendapatkan sertifikat halal. Penggunaan pelarut tergantung pada tujuan penelitian. Jika untuk menarik suatu zat tertentu, maka digunakan pelarut yang dapat melarutkan bahan lain dan menyimpan utuh bahan yang digunakan. Jenis pelarut juga berpengaruh pada nilai LC₅₀ nya. Ekstrak akuades sebenarnya tidak spesifik menarik suatu zat tertentu, namun keamanannya sebagai obat semakin tinggi.

Penelitian ini terbatas hanya meneliti nilai LC₅₀ ekstrak akuades daun singkong. Selanjutnya nilai LC₅₀ dapat dijadikan indikasi kemungkinan toksisitas ekstrak daun singkong. Mekanisme yang menyebabkan kematian pada larva *Artemia salina* Leach diperoleh dari literatur mengenai penelitian serupa. Informasi lain mengenai ekstrak daun singkong, dipelukan penelitian lebih lanjut.

SIMPULAN

Nilai LC₅₀ ekstrak akuades daun singkong yang diuji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach dengan metode *Brine Shrimp lethality Test* adalah 493,86 µg/ml. Nilai tersebut memiliki tingkatan yang rendah sehingga tidak toksik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada yang terhormat Prof. Dr. Priyantini Widiyaningrum, MS yang telah memberikan banyak masukan selama penelitian dan selama penyusunan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, D., Suhada, A., & Rahmawati, S. (2017). Efektivitas ekstrak etanol daun singkong (manihot esculenta) dalam mengobati luka bakar kulit punggung tikus (*Rattus novergicus*) jantan. *Jurnal Farmasetis*, 6(2), 39-46
- Bokanisereme, Yusuf, U.F., & Okechukwu, P.N. (2013). Anti-inflammatory, analgesic, and anti-pyretic activity of cassava leaves extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(4), 89-92
- Miladiyah, I., Dayi, F., & Desrini, S. (2011). Analgesic activity of ethanolic extract of Manihot esculenta Crantz leaves in mice. *Universa Medicina*, 30(1), 3-10
- Megawati, S., Nur'aini, & Kurniasih, D. (2020). Uji efektivitas gel ekstrak etanol 96% daun singkong (Manihot esculenta Crantz.) pada penyembuhan luka sayat kelinci jantan galur New Zealand White. *Jurnal Farmagazine*, 7(1), 1-12.
- Moshi, M.J., Innocent, E., Magadula, J.J., Otieno, D.F., & Weisheit, A. (2010). Brine shrimp toxicity of some plants used as traditional medicines in Kagera Region, Northwestern Tanzania. *Tanzania Journal of Health Research*, 12(1), 63-67.
- Mustarichie, R., Sulistiyaningsih, S., & Runadi, D. (2020). Antibacterial activity test of extracts and fractions of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* causing acne. *International Journal of Microbiology*. ID.1975904
- Nisa, V.M., Zahara, M., & Puji, A. (2013). Efek pemberian ekstrak daun singkong (manihot esculenta) terhadap proses penyembuhan luka gingiva tikus. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*. Universitas Jember.
- Nurdiana, A. R. (2013). Uji ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta*) terhadap jumlah neutrofil pada proses penyembuhan luka tikus (*Rattus norvegicus*). *Skripsi*. Universitas Jember.
- Rita, W.S., Suirta, I.W., & Sabikin, A. (2008). Isolasi dan identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antitumor pada daging buah pare (*Momordica charantia* L.). *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*, 2(1).
- Sukmawati, S.S., Hastuti, S., & Rejeki, S. (2021). Activity test of the ethanol extract of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against the healing of crosses in rabbit. *Indonesian Journal on Medical Science*, 8(2), 160-165.

- Supriningrum, R., Sapri, & Pranamala, V.A. (2016). Uji toksisitas akut ekstrak etanol akar kb (*Coptosapelta tomentosa* Valetton ex K.Heyne) dengan metode brine shrimp lethality test (BST). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 2(2), 161-165.
- Sutiningsih, D., Wuryanto, M.A., Susanto, H.S., Hariyadi, S., & Mustofa. (2020). anticancer activity of linamarin from cassava leaves (*Manihot esculenta* Cranz) on raji cells. *International Journal of Cancer Research*, 16(1), 18-27,
- Triana, L., & Kamila, L. (2018). Analisis kadar asam sianida pada ubi kayu yang direndam dalam larutan nahco3 20% dengan variasi waktu. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa*, 1(2), 130-136
- Yusuf, U.F., Fakhru'l-Razi, A., Rosli, R., Iyuke, S.E., Billa, N., Abdullah, N., & Umar-Tsafe, N. (2006). An in vitro inhibition of human malignant cell growth of crude water extract of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and commercial linamarin. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 28(Suppl. 1), 145-155.