

Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Buah Sirih (*Piper betle* L.) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Angelique C. M. Tanan,¹ Fona Budiarmo,² Widdhi Bodhi,² Fatimawali,² Billy J. Kepel,² Aaljte Manampiring²

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Sam Ratulangi Manado, Sulawesi Utara, Indonesia

²Bagian Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado, Sulawesi Utara, Indonesia

Penulis Korespondensi: angeliquetanan@gmail.com

Abstract: Cancer is one of the causes of high mortality rate in the world. Side effects and the high cost of treatment are a problem for cancer sufferers. The use of herbal medicine is increasingly chosen as an alternative cancer treatment because of the fewer side effects and affordable price. Betel (*Piper betle* L.) is one of the plants of *Piper* genus that is often used as a medicinal plant. This study was aimed to determine the cytotoxic activity test of the ethanol extract of betel fruit against the *Artemia salina* Leach. The cytotoxic test using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The concentrations given are 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 0 ppm. Observations on *Artemia salina* larvae were carried out for 24 hours after administration of the extract. The results showed that the ethanolic extract of betel fruit has a high toxic value, is the LC_{50} value of 60.05 ppm. In conclusion, the ethanol extract of betel fruit is cytotoxic and has the potential as an anticancer.

Keywords: Cytotoxic test; Betel Fruit (*Piper betle* L.); Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Abstrak: Kanker merupakan salah satu penyebab tingginya angka kematian di dunia. Efek samping dan biaya yang mahal dari pengobatan menjadi masalah bagi para penderita kanker. Penggunaan obat herbal semakin banyak dipilih sebagai pengobatan alternatif kanker dikarenakan efek samping yang lebih sedikit dan harga yang terjangkau. Sirih (*Piper betle* L.) adalah salah satu tanaman dari genus *Piper* yang sering dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol buah sirih terhadap *Artemia salina* Leach. Penelitian uji sitotoksik menggunakan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Konsentrasi yang diberikan yaitu 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 0 ppm. Pengamatan pada *Artemia salina* dilakukan selama 24 jam setelah pemberian ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah sirih memiliki nilai toksik yang tinggi, yaitu nilai LC_{50} sebesar 60,05 ppm. Sebagai simpulan, ekstrak etanol buah sirih bersifat sitotoksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Kata Kunci: Uji sitotoksik; Buah Sirih (*Piper betle* L.); *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

PENDAHULUAN

Kanker adalah kelainan genetik disebabkan oleh mutasi DNA yang sebagian besar terjadi spontan atau diinduksi oleh pengaruh lingkungan. Kanker bersifat tumbuh cepat dan menyebar lokal dan ke tempat yang jauh (metastatis) serta dapat menyebabkan kematian.¹ Berdasarkan data *Global Burden of Cancer* (Globocan) tahun 2020, total kasus kanker di Indonesia terdapat 396.914 kasus baru dengan jumlah kematian mencapai 234.511 kasus. Kasus kanker terbanyak di Indonesia adalah kanker payudara dengan jumlah 65.858 kasus.² Beberapa upaya yang dapat dilakukan dalam pengobatan kanker yaitu operasi, radiasi, kemoterapi dan lain-lainnya. Namun beberapa orang memilih obat herbal sebagai pengobatan kanker dikarenakan efek samping yang terjadi lebih sedikit dan harga yang lebih terjangkau.

Piper betle L. atau sirih adalah salah satu jenis tanaman yang sering digunakan sebagai tanaman obat. Tanaman *Piper betle* L. berasal dari famili Piperaceae yang tersebar didaerah tropis dan subtropis.³ Di Indonesia, tanaman ini dapat ditemukan di pulau Jawa, Sumatra, Kalimantan, Sulawesi, Maluku dan Papua.⁴ Tanaman Sirih (*Piper betle* L.) memiliki ciri khas yaitu berbau aromatis disebabkan oleh adanya minyak atsiri. Tanaman sirih (*Piper betle* L.) dimanfaatkan sebagai antisariawan, antiseptik, antibakteri, antiinflamasi dan lain-lainnya. Dalam ekstrak buah sirih terkandung senyawa aktif seperti fenol, flavonoid, tannin, kavikol dan estragol.⁵ Tanaman yang mengandung senyawa flavonoid dapat digunakan sebagai antikanker, antioksidan, antiinflamasi, antialergi, dan antihipertensi.⁶

Senyawa sitotoksik adalah suatu senyawa atau zat yang dapat menghancurkan sel normal dan sel kanker, dan juga dapat menghambat pertumbuhan sel tumor malignan.⁷ Untuk menguji efek sitotoksik dari suatu bahan alam dilakukan uji hayati untuk mengetahui aktivitas antikanker. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah salah satu metode dalam menguji efek sitotoksik ekstrak tanaman terhadap larva *Artemia salina* Leach. Larva *Artemia salina* Leach merupakan sejenis udang primitif yang digunakan sebagai hewan coba untuk uji toksisitas bahan alam dengan metode BSLT.⁸ Suatu senyawa dikatakan toksik berdasarkan metode BSLT jika hasil uji

ekstrak tumbuhan tersebut memiliki $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai usaha pengembangan obat alternatif antikanker.⁹

Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis tertarik untuk melakukan penelitian untuk menguji aktivitas sitotoksik ekstrak etanol buah sirih (*Piper betle* L.) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol buah sirih (*Piper betle* L.) terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT.

METODE PENELITIAN

Desain penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi MIPA Universitas Sam Ratulangi dilakukan selama bulan September-November 2021. Populasi yang digunakan yaitu tanaman Sirih (*Piper betle* L.). Sampel yang digunakan adalah buah Sirih yang diambil dari Mogolaing, Kotamobagu Barat, Kotamobagu, Sulawesi Utara.

Dengan pemberian ekstrak etanol buah Sirih (*Piper betle* L.) pada larva *Artemia salina* Leach dalam metode BSLT di harapkan dapat terlihat seberapa besar aktivitas toksik pada ekstrak etanol buah Sirih (*Piper betle* L.) sebagai tumbuhan obat antikanker.

Alat yang digunakan adalah toples kaca, gunting, ayakan mesh, blender, sarung tangan, timbangan analitik, cawan penguap, erlenmeyer, gelas ukur, spatel, rak tabung reaksi, corong, pinset, tabung reaksi, mistar berskala, autoclave, incubator, oven, *hotplate*, kertas label, batang pengaduk, pipet tetes, gelas kimia, kertas saring, aluminium foil, lampu 24 watt, wadah plastik berukuran sedang, wadah plastik transparan untuk penetasan larva *Artemia salina* dan labu takar.

Bahan yang digunakan adalah tanaman buah Sirih (*Piper betle* L.), ekstrak buah Sirih (*Piper betle* L.), etanol 96%, larva *Artemia salina* Leach, air laut, CMC 1%, NaCl 0,9%, aquadest, NH_3 (Ammonia), asam sulfat, pereaksi Meyer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, asam sulfat pekat, HCL pekat, FeCl_3 (besi (III) klorida) asetat anhidrat, bubuk magnesium.

Sampel buah sirih (*Piper betle* L.) dicuci dengan air mengalir lalu ditiriskan.

Kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C. Sampel yang telah kering dihaluskan sehingga diperoleh serbuk simplisia buah sirih. Simplisia buah sirih di ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Sebanyak 50 mg telur *Artemia salina* dimasukkan ke dalam wadah khusus untuk penetasan telur larva *Artemia salina* yang sudah diisi air laut. Untuk air laut menggunakan air laut alami yang diambil dari daerah Malalayang kota Manado. Kemudian wadah tersebut disinari cahaya lampu 24 watt untuk menghangatkan suhu dalam penetasan dan merangsang penetasan telur. Telur *Artemia salina* akan menetas dalam waktu 24 jam untuk menjadi larva, namun larva yang akan digunakan sebagai hewan uji yang berumur 48 jam dan aktif bergerak. Larva yang berumur 48 jam bersifat peka, membran sel larva masih lunak sehingga memudahkan senyawa asing dalam air laut masuk ke dalam tubuh larva.

Konsentrasi larutan yang digunakan untuk uji metode BSLT adalah 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 10 ppm, dan larutan kontrol tanpa diberikan penambahan ekstrak. Larutan stok dibuat dengan mencampurkan ekstrak kental etanol 96% sebanyak 50 mg dan dilarutkan dengan air laut sebanyak 50 mL. Pada larutan stok ditambahkan CMC 1% sebanyak 1 gram pada setiap 100 mL larutan stok.

Pada uji sitotoksik masing-masing larutan konsentrasi akan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan total larutan konsentrasi yang akan diuji sebanyak 18 larutan. Setiap larutan konsentrasi akan diberikan 10 larva *Artemia salina* Leach. Pengamatan akan dilakukan selama 24 jam, kemudian setiap larutan konsentrasi hitung jumlah kematian larva *Artemia salina* dengan menggunakan bantuan kaca pembesar (lup). Kriteria standar untuk mengukur kematian larva yaitu apabila larva tidak menunjukkan pergerakan selama pengamatan.

Hitung persentase kematian dari setiap kelompok hewan uji. Setelah didapatkan persen kematian larva dari setiap kelompok hewan uji, tentukan nilai probit dari tiap kelompok hewan uji berdasarkan persen kematian larva dan tabel probit. Setelah didapatkan nilai probit dari setiap kelompok, data tersebut akan dianalisis menggunakan *Microsoft Office Excel* untuk mendapatkan nilai LC₅₀.

HASIL PENELITIAN

Ekstrak buah Sirih (*Piper betle* L.) diperoleh melalui proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi untuk mendapatkan zat aktif dalam buah sirih (*Piper betle* L.). Sampel yang telah halus dimaserasi dengan pelarut etanol 96%.

Hasil filtrat buah sirih dengan metode maserasi menghasilkan ekstrak etanol buah sirih yang sangat kental, berwarna coklat pekat, lengket dan bau aromatik khas tanaman sirih sebanyak 8,21 gram. Metode BSLT adalah salah satu metode untuk menentukan toksisitas senyawa bioaktif yang berasal dari alam. Penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali agar pengujian yang dilakukan lebih akurat. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 0 ppm (kontrol negatif).

Tabel 1 menunjukkan hasil dari skrining fitokimia ekstrak etanol buah sirih. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol buah sirih positif mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, tripenoid, fenolik

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Buah Sirih.

Senyawa Fitokimia	Pereaksi	Hasil Uji
Alkaloid	Wagner	Positif
	Mayer	Positif
	Dragendroff	Positif
Flavonoid	Wilsatater	Positif
	Bate Smite-Metcalf	Positif
	NaOH	Positif
Saponin	Dipanaskan dan dikocok	Positif
Tanin	Dididihkan dan FeCl ₃	Positif
Tripenoid	Asetat anhidrat dan H ₂ SO ₄	Positif
Fenolik	FeCl ₃	Positif

Tabel 2 menunjukkan pengaruh konsentrasi ekstrak etanol buah sirih terhadap *Artemia salina* dan berdasarkan total kematian larva, didapatkan persen kematian dari *artemia salina*.

Tabel 2. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Etanol Buah Sirih terhadap *Artemia salina* Leach

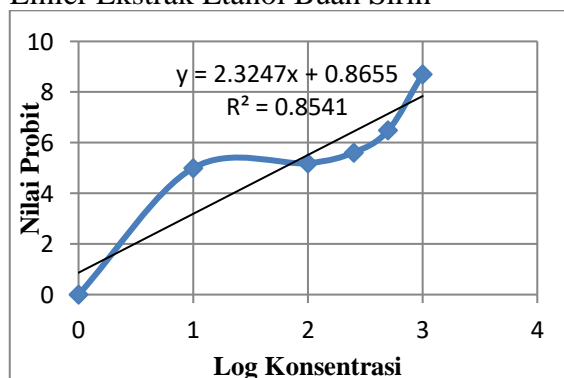
Kosentrasi (ppm)	Perlakuan			Total Kematian	Rerata Kematian	Persen Kematian
	T1	T2	T3			
0	0	0	0	0	0	0
10	5	4	6	15	5	50
100	5	7	5	17	5.6	56
250	8	6	8	22	7.5	73
500	9	10	9	28	9.3	93
1000	10	10	10	30	10	100

Tabel 3. diperoleh data untuk menghitung persamaan regresi linear hubungan antara Y (nilai probit berdasarkan persentasi kematian) dan X (log konsentrasi). Pada grafik persamaan regresi linier gambar 1. diperoleh nilai $Y = 2,3247x + 0,8655$ sehingga didapatkan nilai LC_{50} adalah 60,05 ppm.

Tabel 3. Perhitungan LC_{50} dengan metode probit

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (X)	Kematian (%)	Probit (Y)
0	0	0	0
10	1	50	5
100	2	56	5,19
250	2,398	73	5,61
500	2,699	93	6,48
1000	3	100	8,71

Gambar 1. Grafik Persamaan Regresi Linier Ekstrak Etanol Buah Sirih



BAHASAN

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah buah sirih (*Piper betle* L.). Sampel diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Tujuan dilakukan ekstraksi adalah untuk mengambil senyawa metabolit yang ada dalam sampel. Kelebihan metode maserasi yaitu metode yang mudah untuk dilakukan, murah, peralatan yang relatif mudah ditemukan, dan dilakukan tanpa proses pemanasan untuk menghindari terjadinya kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas pada buah sirih. Pelarut yang digunakan adalah pelarut etanol 96%. Pelarut etanol dipilih karena bersifat polar dan mampu menyari senyawa kimia lebih banyak bila dibandingkan dengan methanol dan air.¹⁰

Ekstrak etanol buah sirih (*Piper betle* L.) dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit yang terkandung didalamnya. Berdasarkan hasil pengujian ekstrak etanol buah sirih (*Piper betle* L.) untuk uji alkaloid menggunakan 3 pereaksi yaitu pereaksi *Wagner*, pereaksi *Mayer*, dan pereaksi *Dragendorff*. Prinsip pengujian alkaloid yaitu reaksi pengendapan terjadi karena adanya peran atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dalam pereaksi tersebut sehingga membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam. Hal ini menyebabkan terbentuknya endapan coklat pada penambahan peraksi *Wagner*, endapan putih pada pereaksi *Mayer*, endapan jingga pada pereaksi *Dragendorff* untuk uji alkaloid pada ekstrak etanol buah sirih.

Pada uji flavonoid menggunakan tiga pereaksi yaitu pereaksi *Wilsatater*, pereaksi *Bate Smite-Metcalfe*, dan NaOH menunjukkan hasil positif pada ketiga pereaksi tersebut. Hasil uji flavonoid sesuai dengan penelitian

Venila *et al* (2020) bahwa buah sirih (*Piper betle* L.) mengandung senyawa kimia flavonoid.

Pada uji saponin menunjukkan hasil positif dengan terbentuk busa yang stabil setelah dipanaskan dan dikocok. Pembentukan busa terjadi karena pada struktur saponin memiliki glikosida yang bersifat polar dan cincin steroid yang bersifat non polar. Senyawa yang memiliki gugus polar dan non polar bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air maka hanya glikosida gugus polar berikatan dengan air sedangkan gugus non polar akan menolak air.

Pada uji tanin menunjukkan hasil positif dengan terbentuk perubahan warna biru kehitaman setelah dididihkan dan diberikan pereaksi FeCl₃. Perubahan warna terjadi ketika penambahan FeCl₃ bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil pada senyawa tanin.¹¹

Pada uji tripenoid dilakukan dengan memberikan penambahan asam anhidrat dan H₂SO₄ berikatan dengan senyawa tripenoid sehingga menghasilkan perubahan warna merah. Perubahan warna tersebut menunjukkan ekstrak etanol buah sirih (*Piper betle* L.) positif mengandung tripenoid.

Pada uji fenolik dilakukan dengan memberikan penambahan FeCl₃ dan terjadi perubahan warna menjadi lebih hitam. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah sirih (*Piper betle* L.) positif mengandung fenolik.

Metode BSLT adalah salah satu metode untuk menentukan toksisitas senyawa bioaktif yang berasal dari alam. Kelebihan metode ini yaitu mudah dikerjakan, waktu yang singkat, murah, dan cukup akurat.¹²

Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat, penelitian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, sehingga total konsentrasi yang dilakukan uji sebanyak 18 larutan. Setiap konsentrasi diberikan 10 ekor larva dan jumlah larva yang digunakan berjumlah 180 ekor. Wadah yang berisikan larutan konsentrasi dan larva diletakkan dibawah lampu. Pengamatan dilakukan selama 24 jam dengan menggunakan bantuan kaca pembesar. Jika larva tidak menunjukkan pergerakan selama pengamatan, maka larva tersebut terhitung mati. Berdasarkan tabel 2. dapat dilihat bahwa jumlah kematian larva tertinggi ada pada konsentrasi 1000 ppm dan jumlah kematian larva terendah ada pada konsentrasi 10 ppm. Semakin tinggi

konsentrasi maka semakin besar tingkat kematian.

Kematian larva *Artemia salina* dikarenakan adanya perubahan konsentrasi antara didalam dan diluar sel. Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa flavonoid dan alkaloid yang menghambat daya makan larva (antifedant). Senyawa – senyawa tersebut akan bertindak sebagai racun perut (stomach poisoning). Jika senyawa – senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva, maka alat pencernaannya akan terganggu dan dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva dan mengakibatkan larva gagal mengenai makanannya sehingga larva mati.¹³ Terdapat beberapa teori mengenai mekanisme flavonoid sebagai antikanker yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker. Terdapat dua jalur dalam pensinyalan apoptosis yaitu jalur ekstrinsik yang terkait dengan tumor necrosis factor (TNF) di membran sel dan jalur intrinsik yang terkait dengan mitokondria. Pada jalur intrinsik terjadi fragmentasi DNA yang diawali dengan dilepaskannya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil. Flavonoid dapat menghambat aktivitas protein kinase, sehingga menghambat proliferasi sel kanker.^{14,15}

Tripenoid memiliki sifat farmakologis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa tripenoid memiliki sifat kemopreventif dan kemoterapi terhadap kanker pada manusia. Tripenoid, golongan monoterpen, golongan triterpen, dan golongan seskuiterpen digunakan sebagai obat antikanker untuk pengobatan tumor yang resisten terhadap kemoterapi dan untuk meminimalkan efek samping pengobatan saat ini.¹⁶

Hasil uji sitotoksik dinyatakan dalam Lethal Concentration 50 (LC50). LC50 adalah konsentrasi optimum ekstrak yang mampu membunuh 50% populasi larva *Artemia salina* Leach.¹⁷ Semakin rendah nilai LC50 menunjukkan efek sitotoksitas yang semakin tinggi.

Hasil penelitian dan data yang diperoleh berdasarkan perhitungan dengan metode analisis probit menggunakan aplikasi *Microsoft Office Exel* didapatkan nilai LC₅₀ dari ekstrak etanol buah sirih (*Piper betle* L.) sebesar 60,05 ppm dan termasuk dalam kategori sangat toksik. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah sirih (*Piper betle*

L.) bersifat toksik dan memiliki potensi sebagai antikanker dikarenakan LC₅₀ yang diperoleh kurang dari 1000 ppm.

SIMPULAN

Ekstrak etanol buah Sirih (*Piper betle* L.) mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, tripenoid, fenolik dan memiliki aktivitas sitotoksik terhadap larva *Artemia salina* Leach dengan diperoleh nilai LC₅₀ yaitu 60,05 ppm sehingga berpotensi sebagai antikanker

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam studi ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mayssara A, Abo Hassanin Supervised A, Robbins Basic Pathology Ninth Edition. Ninth ed. Paper Knowledge. Toward a Media History of Documents. Philadelphia: Elsevier; 2014.
2. The Global Cancer Observatory. Cancer Incident in Indonesia. Int Agency Res Cancer. 2020;858:1–2.
3. Soriano CV. Komposisi Kimia Minyak Atsiri Buah Sirih Hijau (*Piper betle* L.), Kemukus (*Piper Cubea* L.) dan Cabe Jawa (*Piper Retrofractum Vahl*) Gepcomm Diagnostic Essay. 2014;9(1):1–12.
4. Putri AK, Satwika QE, Sulistyana Y, Arindia Z. Studi Morfologi *Piper betle* L. dan Pemanfaatannya dalam Kehidupan Sehari – Hari. Univ Sebel Maret. 2019
5. Makatambah V, Fatimawali F, Rundengan G. Analisis Senyawa Tannin Dan Aktifitas Antibakteri Fraksi Buah Sirih (*Piper betle* L) Terhadap *Streptococcus mutans*. JMIPA. 2020;9(2):75–80
6. Purnama N. Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Tumbuhan Daun Sirih (*Piper betle* L.). Pros Semin Nas MIPA III. 2017;437–41
7. Marliza H, Oktaviani D. Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Kemumu (*Colacasia gigantea Hookf*) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Bencoolen J Pharm. 2021;1(1):38–45.
8. Harli AS. Uji Toksisitas Fraksi Ekstrak Etanol Daun Pedang-Pedang (*Sansevieria trifasciata* Prain) terhadap Larva Udang (*Artemia Salina* Leach) dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). [Skripsi]. 2016;9:15.
9. Sari M, Apriandi A, Suhandana M. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Beruwang Laut (*Scaevola taccada*) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Marinade. 2020;03(01):37–46
10. Riwanti P, Izazih F, Hang U, Surabaya T, Indonesia S, Total F. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50,70 dan 96% *Sargassum polycystum* dari Madura. J Pharm Care Anwar Med. 2020;2(2):82–95.
11. Sangi M, Runtuwene MRJ, Simbala HEI. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. chem Prog. 2008;1(1):47–53.
12. NZ H. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Daun Kesum (*Polygonum minus* Huds) terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Skripsi. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Tanjungpura. Pontianak Jakarta: Universitas Islam Negeri; 2015.
13. Rafiqah, MAstura, MP H. Uji Toksisitas Fraksi Etanol Tanaman Obat yang Digunakan Masyarakat Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test. Chemica. 2019;2(1):14–20.
14. Woo HD, Kim J. Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2013;19(7):1011–9.
15. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. Nutrients. 2020;12(2):1–24.
16. Nerdy N, Lestari P, Sinaga JP, Ginting S, Zebua NF, Mierza V, et al. Brine shrimp (*Artemia salina* leach.) lethality test of ethanolic extract from green betel (*Piper betle* linn.) and red betel (*Piper crocatum* ruiz and pav.) through the soxhletation method for cytotoxicity test. Open Access Maced J Med Sci. 2021;9:407–12.
17. Zuraida Z. Analisis Toksisitas Beberapa Tumbuhan Hutan Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). J Peneliti Hasil Hutan. 2018;36(3):239–4