

**SKRINING FITOKIMIA DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK ETANOL DAUN
BINAHONG (*Andredera cordifolia* (Ten.) Steenis) DENGAN METODE *Brine Shrimp
Lethality Test* (BSLT)**

Putri Ayu Andany Surbakti¹⁾, Edwin De Queljoe¹⁾, Widdhi Boddhi¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado

ABSTRACT

*Binahong Leaves (*Andredera cordifolia* (Ten.) Steenis) is a medicinal plant that can be used for various treatments one of which is used as an anticancer. One of the earliest methods for cytotoxic testing is *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). This research aims to determine the contain of secondary metabolite compounds and the potential toxicity of the leaves binahong. Result of this research showed that the extract of ethanol leaves binahong contain Flavanoids, Steroids, Saponins. Leaves binahong has toxicity value with *Lethality Concentration 50* (LC₅₀) was 97, 797 µg/mL tested using BSLT methods, this show that the extract of ethanol leaves binahong is toxic.*

Keywords: *Binahong Leaves, Phytochemical Screening, Toxicity, BSLT, LC₅₀*

ABSTRAK

Daun Binahong (*Andredera cordifolia* (Ten.) Steenis) merupakan tanaman obat yang dapat digunakan untuk berbagai macam pengobatan salah satunya digunakan sebagai antikanker. Salah satu metode awal untuk uji sitotoksik adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dan potensi toksisitas dari daun binahong. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun binahong memiliki kandungan Flavanoid, Steroid, Saponin. Daun binahong mempunyai nilai toksisitas dengan LC₅₀ sebesar 97, 797 µg/mL menggunakan metode BSLT, hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun binahong bersifat toksik.

Kata kunci: Daun Binahong, Skrining Fitokimia, Toksisitas, BSLT, LC₅₀

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sekitar 30.000 spesies tanaman, 940 di antaranya digunakan sebagai tanaman obat. Penggunaan tanaman obat sebagai pengobatan tradisional merupakan pilihan pengobatan yang kini makin diminati, terlebih lagi dengan kesadaran untuk kembali ke alam dan juga karena relatif aman dan murah, bahkan dengan perkembangan yang kini ada makin mendapat perhatian bagi alternatif pelayanan kesehatan. Dari berbagai penelitian, obat tradisional telah diakui keberadaannya oleh masyarakat, dengan demikian meningkatkan manfaat tanaman bagi kesehatan dan menciptakan kondisi yang mendorong pengembangan obat tradisional (Hendrawati, 2009).

Salah satu tanaman tradisional yang biasa digunakan oleh masyarakat yaitu daun Binahong mempunyai nama latin *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. Daun Binahong juga mempunyai nama umum dari berbagai negara. Di negara Cina binahong dikenal dengan nama *teng san chi*, sedangkan di Inggris nama umum dari binahong yaitu *heartleaf madeiravine* atau *madeira vine*. Binahong merupakan tumbuhan yang diduga berasal dari Australia, Afrika Selatan, Hawaii, New Zealand dan Pulau Pasifik lainnya. Tumbuhan ini mudah tumbuh di dataran rendah maupun dataran tinggi (Pink, 2004).

Penyakit yang dapat disembuhkan dengan menggunakan tanaman ini adalah kerusakan ginjal, diabetes, pembengkakan jantung, muntah darah, tifus, stroke wasir, reumatik, pemulihan pasca operasi, pemulihan pasca melahirkan,

menyembuhkan segala luka dalam dan khitanan, radang usus, melancarkan dan menormalkan peredaran dan tekanan darah, sembelit, sesak napas, sariawan berat, pusing-pusing, sakit perut, menurunkan panas tinggi, menyuburkan kandungan, maag, asam urat, keputihan, pembengkakan hati, meningkatkan vitalitas dan daya tahan tubuh, dan juga digunakan sebagai antikanker (Manoi, 2009).

Saat ini penyakit kanker menempati urutan kedua sebagai penyebab kematian setelah penyakit jantung (Apantaku, 2002). Usaha penyembuhan dengan obat kanker yang ada saat ini kurang memuaskan selain efek samping yang besar, harga yang mahal dan sulit diperoleh. Hal tersebut mendorong dilakukannya pencarian sumber baru senyawa antikanker dari alam.

Salah satu metode awal untuk uji sitotoksik adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT merupakan salah satu metode yang banyak digunakan untuk pencarian senyawa antikanker baru yang berasal dari tanaman. Metode BSLT telah terbukti memiliki korelasi dengan aktivitas antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat. Suatu ekstrak dinyatakan bersifat toksik menurut metode BSLT jika memiliki LC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/mL}$. Jika hasil BSLT menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan bersifat toksik maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa sitotoksik tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat alternatif anti kanker. Jika hasil uji BSLT menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan tidak bersifat toksik maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut

untuk meneliti khasiat-khasiat lain dari ekstrak (Meyer *et al.*, 1982).

Skrining fitokimia dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). Skrining fitokimia merupakan metode yang sederhana, cepat, serta sangat selektif, yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa serta mengetahui keberadaan senyawa-senyawa aktif biologis yang terdistribusi dalam jaringan tanaman (Nohong, 2009).

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), CH₃COOH glacial, NaOH, aquades, FeCl₃, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf, pereaksi wagner, amonia, natrium hidroksida, asam klorida, serbuk magnesium, asam asetat anhidrat, eter, magnesium sulfat, asam sulfat, Etanol 96 %, kloroform, telur udang *Artemia Salina* Leach, air laut.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Ayakan mesh 200, kertas saring whatman 42, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, pipet, baker glass, timbangan analitik, gelas ukur, Erlemenyer, pot salep, toples, lup, lampu, batang pengaduk, alumuium foil, *rotary evaporator*, blender, spatula, corong, labu takar, kertas label, oven, *hotplate*.

Pengambilan dan Persiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), yang diambil di Batu Kota,

Kecamatan Malalayang, Sulawesi Utara. Daun yang diambil adalah daun yang tidak terlalu tua atau terlalu muda, daun berwarna hijau dan segar dengan ukuran daun yang sama (sedang). Daun dipetik satu persatu secara manual, selanjutnya sampel dibersihkan dan dikeringkan, setelah sampel menjadi kering sampel diblender hingga sampel halus lalu diayak dengan ayakan mesh 200.

Ekstraksi Daun

Ekstrak bahan aktif dilakukan dengan maserasi dengan pelarut etanol 96%. Serbuk *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis ditimbang sebanyak 100 gram dan dimasukkan ke dalam baker gelas, kemudian ditambahkan pelarut hingga volume akhir mencapai 500 mL dengan perbandingan 1 : 5 (w/v). Hasil maserasi kemudian disaring dengan kertas saring Whatman 42 sehingga dihasilkan filtrat dan residu. Perendaman dilakukan 1 kali lagi remaserasi. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental berupa pasta.

Skrining Fitokimia

Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL kloroform secukupnya dan 10 mL amonia lalu ditambahkan 10 tetes H₂SO₄. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga membentuk 2 lapisan. Lapisan H₂SO₄ dipindahkan dalam 3 tabung reaksi dengan volume masing-masing 2,5 mL. Ketiga larutan diuji dengan pereaksi Meyer, Dragendorf dan Wagner. Larutan positif pada pereaksi Meyer karena adanya

endapan putih, larutan positif pada pereaksi Dragendorff dengan berubahnya larutan menjadi warna merah jingga, sedangkan larutan positif pada pereaksi Wagner dengan berubahnya warna larutan menjadi warna coklat.

Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL etanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan 10 tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg. Adanya flavonoid ditunjukkan oleh timbulnya warna merah coklat.

Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

0,5 gram ekstrak ditambahkan CH_3COOH glacial sebanyak 10 tetes dan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Larutan menjadi positif pada triterpenoid jika larutan berubah menjadi warna merah atau ungu, dan larutan positif pada steroid jika larutan berubah menjadi warna biru atau hijau.

Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL akuades kemudian dikocok kuat selama kurang lebih 1 menit. Selanjutnya didiamkan selama 10 menit dan diamati buih atau busa yang terbentuk. Keberadaan senyawa saponin dalam sampel ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil selama 10 menit dengan tinggi 1 - 3 cm.

Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambahkan dengan 10 mL air panas,

kemudian ditetesi menggunakan besi (III) klorida, keberadaan tanin dalam sampel di tandai dengan timbulnya warna hijau kehitaman.

Penyiapan Larva *Artemia Salina* Leach

Penetasan telur *Artemia Salina* Leach dilakukan dengan cara merendam sebanyak 30 mg telur *Artemia Salina* Leach dalam wadah berisi air laut dibawah cahaya lampu 25 watt. Telur *Artemia Salina* Leach akan menetas dan menjadi larva setelah 24 jam.

Pembuatan Konsentrasi Sampel Uji

Konsentrasi Larutan uji BSLT adalah 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, dan 0 $\mu\text{g/mL}$ (sebagai kontrol negatif). Untuk pembuatan larutan stok ekstrak kental etanol 96% ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan dengan kedalam air laut sebanyak 50 mL, hingga diperoleh konsentrasi larutan stok 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Pelaksanaan Uji Toksisitas

Pada uji toksisitas disiapkan wadah untuk pengujian, untuk masing - masing konsentrasi ekstrak sampel membutuhkan 3 wadah dan 1 wadah sebagai kontrol untuk masing – masing pengulangan. Selanjutnya pada tiap konsentrasi larutan dimasukan 10 ekor larva *Artemia Salina* Leach. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva *Artemia Salina* Leach, dimana setiap konsentrasi dilakukan 3 pengulangan dan dibandingkan dengan kontrol. Kriteria standar untuk menilai kematian larva *Artemia Salina* Leach yaitu bila larva *Artemia Salina* Leach tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa detik observasi.

Analisis Data

Data hasil penelitian akan diolah dan disajikan dalam bentuk tabel. Data dari uji toksisitas akan dianalisis dengan analisis regresi linier menggunakan SPSS 23 untuk menentukan nilai LC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan Sampel

Tanaman yang digunakan adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diambil di daerah Batu Kota, Manado, Sulawesi Utara. Pada penelitian ini daun yang dipetik/diperoleh adalah daun binahong dengan batang yang berwarna merah. Daun yang diambil adalah daun yang tidak terlalu tua atau terlalu muda, daun berwarna hijau dan segar dengan ukuran daun yang sama (sedang). Daun dipetik satu persatu secara manual. Setelah daun diperoleh kemudian dilakukan sortasi dan pencucian, serta pengeringan.

Tujuan dari sortasi dan pencucian adalah untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan kotoran lain yang masih tertinggal pada daun dengan menggunakan air bersih yang mengalir. Sebelum dilakukan pengeringan terlebih dulu dilakukan perajangan yang bertujuan untuk mempermudah proses pengeringan, karena semakin tipis atau kecil daun maka semakin cepat proses penguapan, kemudian pengeringan dilakukan dengan cara dikeringkan pada suhu kamar, bukan di bawah sinar matahari tapi hanya diangin-anginkan. Tujuan pengeringan ialah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama.

Setelah daun kering, dilakukan tahapan pembuatan serbuk simplisia kering (penghalusan) dengan cara diblender,

kemudian diayak dengan ayakan mesh 200 bertujuan agar serbuk simplisia yang diperoleh homogen.

Ekstraksi

Serbuk simplisia daun binahong kemudian diekstraksi dengan metode maserasi. Serbuk simplisia daun binahong yang digunakan 100 gram dan diekstraksi dengan pelarut etanol 96% selama 5 hari dan dilakukan remaserasi 1 kali selama 2 hari. Pemilihan metode maserasi dikarenakan metode maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena selain murah dan mudah dilakukan, dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut (Harbone, 1987). Setelah dilakukan ekstraksi, ekstrak yang diperoleh dimasukkan kedalam alat rotary evaporator bertujuan untuk memekatkan konsentrasi larutan sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih tinggi (ekstrak kental). Ekstrak kental daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) ditimbang sebanyak 12,6 gram.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan berdasarkan metode Harbone (1987), dan dilakukan 5 pengujian untuk senyawa kimia yakni Alkaloid, Flavonoid, Steroid/Tripterpenoid, Tanin, Saponin. Skrining fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa-senyawa metabolit sekunder pada tanaman. Hasil

pengujian dari skrining fitokimia daun binahong dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

Senyawa Metabolit	Hasil Pengujian	Perubahan Yang Terjadi
Alkaloid	Positif (Meyer) Negatif (Dragendrof) Negatif (Wagner)	Meyer (Putih, ada endapan putih), Dragendrof (Kuning pucat), Wagner (Kuning terang)
Flavonoid	Positif	Warna merah cokelat
Steroid/ Triterpenoid	Positif	Hijau (Steroid)
Saponin	Positif	Terbentuknya buih atau busa
Tanin	Negatif	Warna merah kecoklatan

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder pada daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), dan metabolit sekunder yang diperoleh positif yaitu flavonoid dan terjadi perubahan warna merah cokelat, berdasarkan penelitian Seniwaty *et al.*, (2009) hasil positif pada flavonoid pada skrining fitokimia pada tanaman lidah ular terjadi perubahan warna larutan menjadi merah cokelat, hal ini dikarenakan terbentuknya garam flavilium.

Skrining fitokimia daun binahong pada steroid positif karena adanya perubahan warna hijau, hal ini dikarenakan terjadi reaksi antara steroid dan asam asetat yang menghasilkan kompleks asetil steroid,

sedangkan skrining fitokimia positif pada saponin, terbentuknya buih atau busa, hal ini dikarenakan saponin merupakan senyawa yang memiliki gugus polar dan nonpolar bersifat aktif permukaan sehingga ketika saponin dikocok dapat membentuk buih atau busa.

Menurut Setiawan (2013) sampel dikatakan mengandung alkaloid jika reaksi positif yang membentuk endapan sekurang-kurangnya dua reaksi dari golongan reaksi pengendapan yang dilakukan. Dan dari hasil pengujian pada alkaloid, dari 3 golongan reaksi pengendapan yang dilakukan, hanya 1 yang menghasilkan positif (pereaksi meyer), maka untuk pengujian alkaloid, diperoleh hasil negatif atau daun binahong tidak

mengandung alkaloid. Ketiga senyawa metabolit sekunder yang diperoleh dalam pengujian ini dapat memberikan efek farmakologi pada manusia.

Uji toksisitas dengan Metode Brine Shimp Lethaly Test (BSLT)

Pengujian toksisitas dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menggunakan Larva udang *Artemia Salina* Leach. Konsentrasi untuk tiap perlakuan ada terbagi atas 1000, 500, 250, 100, 10 µg/mL dan kontrol negatif. Namun dalam hal ini, saat penelitian didapatkan kendala, dimana saat akan dilakukan penetasan untuk telur larva udang tidak menetas, sehingga peneliti mengganti telur larva udang yang baru dan air laut dengan air

laut buatan yang dibuat dengan cara melarutkan 20 gram garam non yodium kedalam 1 liter aquades, kemudian larva udang menetas. Setelah 48 jam larva udang dipindahkan dalam wadah tiap-tiap konsentrasi, saat dilakukan pengenceran, air laut juga diganti dengan air laut buatan. Hal ini dikarenakan untuk menyesuaikan lingkungan hidup dari larva udang, karena air yang digunakan untuk penetasan yaitu air laut buatan maka saat perlakuan untuk tiap konsentrasi dibuat sama yaitu air laut buatan. Setelah larva diberikan pengujian dan diamati selama 24 jam, hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Pengujian	Kontrol Negatif	Jumlah Kematian Setiap Konsentrasi				
		10µg/mL	100µg/mL	250µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL
1	0	3	6	10	10	10
2	0	3	6	10	10	10
3	0	4	8	8	9	10
Total Kematian Larva	0	10	20	28	29	30
Rata- rata	0	3,3	6,6	9,3	9,6	10
Presentase Kematian	0	33%	66%	93%	96%	100%

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 1000 µg/mL adalah tingkat kematian tertinggi, dan tingkat kematian terendah pada konsentrasi 10 µg/mL. Untuk tiap konsentrasi dimasukkan larva udang sebanyak 10 ekor, dan dibandingkan dengan kontrol, setelah itu dilakukan perhitungan analisis probit menggunakan SPPS 23 dan hasilnya yaitu 97, 797 µg/mL. Berdasarkan penelitian Sukandar *et al.*, (2009) pada pengujian toksisitas ekstrak daun pandan wangi, mendapatkan nilai $LC_{50} < 1000$ µg/mL sekaligus berpotensi sebagai antikanker.

Suatu ekstrak dinyatakan aktif dan bersifat toksik jika dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi kurang dari 1000 ppm dan bersifat tidak toksik jika ditemukan pada konsentrasi lebih dari 1000 ppm, dan kematian larva udang *Artemia Salina* Leach disebabkan keberadaan senyawa metabolit sekunder yang bersifat toksik, senyawa toksik yang ada pada ekstrak dapat masuk melalui bagian mulut larva udang *Artemia Salina* Leach dan diabsorpsi masuk ke dalam saluran pencernaan terjadi proses absorpsi melalui membran sel. Setelah proses absorpsi dilanjutkan dengan proses distribusi senyawa toksik ke dalam tubuh larva udang *Artemia Salina* Leach, dan terjadi proses kerusakan reaksi metabolisme (Raineri, 1981).

Struktur anatomi tubuh larva udang *Artemia Salina* Leach pada tahap naupli masih sangat sederhana, yaitu terdiri dari lapisan kulit, mulut, antena, saluran pencernaan atau digesti yang masih sederhana, dan calon thoracopoda. Perubahan gradien konsentrasi yang drastis

antara di dalam dan di luar sel yang menyebabkan senyawa toksik mampu menyebar dengan baik ke tubuh larva udang *Artemia Salina* Leach. Efek kerusakan metabolisme yang ditimbulkan terjadi secara cepat dapat dideteksi dalam waktu 24 jam, hingga menyebabkan 50% kematian larva udang *Artemia Salina* Leach (Raineri, 1981).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

- 1) Metabolit sekunder yang terkandung dalam Ekstrak etanol daun binahong (*Androdera cordifolia* (Ten.) Steenis) yaitu Flavonoid, Steroid, Saponin.
- 2) Ekstrak etanol daun binahong (*Androdera cordifolia* (Ten.) Steenis) memiliki potensi toksisitas dengan nilai LC_{50} sebesar 97, 797 µg/mL.

Saran

Dengan hasil penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa sitotoksik tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat antikanker mengingat bahwa daun binahong (*Androdera cordifolia* (Ten.) Steenis) bersifat toksik.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, G. 2002. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Sebagai Senyawa Bioaktif dari Bahan Alam. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. Jurusan Farmasi MIPA Universitas Hasanuddin. **6(2)**: 432-435.
- Apantaku, L.M. 2002, Breast-conserving surgery for breast cancer. *Am. Fam. Physician*. **66(12)**: 2271-2278.

- Bougis, P. (1979). *Marine Plankton Ecology*. American Elsevier Publishing Company, New York.
- Badan POM RI. 2008. *Direktorat Obat Asli Indonesia*. Badan POM, Jakarta.
- Gunawan, S. G. 2007. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Departement Farmakologi dan Terapeutik FK UI, Jakarta.
- Gritter, R. J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. ITB, Bandung.
- Harbone, J.B.1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB, Bandung.
- Hendrawati A. R. S. 2009. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* Linn.) Terhadap *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Skripsi*: Universitas Diponegoro, Semarang.
- Khrisnaraju A. V., Rao dan Sundraraju, A. 2005. *Assessment of Bioactivity of Indian Medical Plants Using Brine Shrimp (Artemia salina) Lethality Assay*. International Journal Applied Science and Engineering. **2**: 125-134.
- Mansyur. 2004. *Toxicology Efek - Efek Yang Tidak Diinginkan*. USU digital library, Medan.
- Manoi, F. 2009. *Binahong (Anredera cordifolia) Sebagai Obat*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Jakarta.
- Meyer, B. N., Ferrigni, Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols dan McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. **45**: 31-34.
- Ngatidjan. 1997. *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Nohong. 2009. Skrining Fitokimia Tumbuhan *Ophiopogon* jaburan Lodd dari Kabupaten Kolaka Provinsi Sulawesi Tenggara. *Jurnal Pembelajaran Sains*. **5(2)**: 172-178.
- Pissuthanan, S., dkk. 2004. Brine Shrimp Lethality Activity of Thai Medicinal Plants in the Family Meliaceae. *Naresuan University Journal*. **12(2)**: 13-18.
- Pink A. 2004. *Gardening for the million*. Project Gutenberg Literary Archive.
- Paget, G. E. 1970. *Method In Toxicology*. Blackwell Scientific Publication Oxford and Edinburgh, England.
- Raineri, M. Histochemical Localization of Chitin in Larvae of *Artemia salina* Leach (Phyllopora). 1981. Italian Journal of Zoology **48 (2)**: 139 -141.
- Rice, S. A., Maness, I. B. 2009. *Brine Shrimp Bioassay: A Useful Technique in Biological Investigations*. *The American Biology Teacher* [Serial Online]. **66(3)**:208-215.
- Rossiana, Nia. 2006. Uji Toksisitas Limbah Cair Tahu Sumedang Terhadap Reproduksi *Daphnia carinata* King. *Skripsi*: Universitas Padjajaran, Bandung.
- Setiawan, P.Y.B. 2013. Penerapan Metode Simplex Lattice Design Dalam penentuanh Komposisi Etanol- Air Pada Proses Ekstraksi Daun Pepaya (*Carica Papaya*) Dengan Respon Aktivitas Larvasida Nyamuk *Aedes Aegypti*. *Skripsi*: Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Seniwaty., Raihanah., Nugraheni. I.K., Umaningrum. D. 2009. Skrining Fitokimia Dari Alang-Alang (*Imperata Cylindrica* L. Beauv) Dan Lidah Ular (*Hedyotis Corymbosa* L.

