

**UJI TOKSISITAS AWAL TIGA EKSTRAK BERBASIS KOLIN KLORIDA
DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* (L.) Less.) MENGGUNAKAN
METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)**

Skripsi

**Untuk melengkapi syarat-syarat guna memperoleh gelar Sarjana Farmasi
pada Program Studi Farmasi**

Oleh:

LATHIFAH AS'AD DZULNIA SEKAR

1904015156



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
JAKARTA
2024**

Skripsi dengan Judul

**UJI TOKSISITAS AWAL TIGA EKSTRAK BERBASIS KOLIN KLORIDA
DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* (L.) Less.) MENGGUNAKAN
METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)**

Telah disusun dan dipertahankan di hadapan penguji oleh:
LATHIFAH AS'AD DZULNIA SEKAR, NIM 1904015156

Tanda Tangan

Tanggal

Ketua

Wakil Dekan I

Dr. apt. Fith Khaira Nursal, M.Si.

21/06/2024

Penguji I

apt. Vera Ladeska, M.Farm.

14/06/2024

Penguji II

Wahyu Hidayati, M.Biomed.

10/06/2024

Pembimbing I

Ni Putu Ermi Hikmawanti, M.Farm.

31/05/2024

Pembimbing II

apt. Agustin Yumita, M.Si.

20/6/2024

Mengetahui:

Ketua Program Studi Farmasi

Dr. apt. Rini Prastiwi, M.Si.

20-6-2024

Dinyatakan lulus pada tanggal: **13 Februari 2024**

ABSTRAK

UJI TOKSISITAS AWAL TIGA EKSTRAK BERBASIS KOLIN KLORIDA DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* (L.) Less.) MENGGUNAKAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)

Lathifah As'ad Dzulnia Sekar

1904015156

Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) merupakan tanaman yang mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pelarut *natural deep eutectic solvent* (NADES) berbasis kolin klorida merupakan pelarut alternatif berbahan alami yang relatif aman dan ramah lingkungan untuk ekstraksi metabolit tanaman. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui toksisitas awal tiga pelarut dan ekstrak berbasis kolin klorida menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larve udang *Artemia salina* Leach (larva udang). Pelarut NADES pada penelitian ini dibuat dari kolin klorida-urea (1:2), kolin klorida-asam laktat (1:2), dan kolin klorida-1,3-butanediol (1:6) dengan penambahan air 30% (v/v). Ekstraksi daun beluntas dengan NADES difasilitasi dengan bantuan ultrasonik. Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak dan pelarut kolin klorida-urea (1:2), kolin klorida-asam laktat (1:1), dan kolin klorida-1,3-butanediol (1:6) maka semakin tinggi persentase kematian larva udang. Ekstrak dan pelarut kolin klorida-asam laktat (1:1) mampu membunuh larva udang pada konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan ekstrak dan pelarut kolin klorida-urea (1:2) dan kolin klorida-1,3-butanediol (1:6).

Kata Kunci: Beluntas, NADES, *Artemia salina* Leach, BSLT, Fitokimia, Toksisitas

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, penulis memanjatkan puji dan syukur ke hadirat Allah SWT karena berkat rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi, dengan judul **“UJI TOKSISITAS AWAL TIGA EKSTRAK BERBASIS KOLIN KLORIDA DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* (L.) Less.) MENGGUNAKAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT)”**.

Penulisan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi tugas akhir sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, Jakarta.

Pada kesempatan yang baik ini penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Mama, papa dan keluargaku tercinta atas doa, dorongan semangat, serta dukungannya, baik morel maupun materi, kepada penulis.
2. Bapak Dr. apt. Hadi Sunaryo, M.Si. selaku Dekan Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA.
3. Ibu Dr. apt. Fith Khaira Nursal, M.Si. selaku wakil Dekan I Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA.
4. Ibu apt. Kori Yati, M.Farm. selaku wakil Dekan II Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA.
5. Bapak apt. Kriana Effendi, M.Farm. selaku Wakil Dekan III Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA.
6. Bapak Anang Rohwiyono, M.Ag. selaku Wakil Dekan IV Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA.
7. Ibu Dr. apt. Rini Prastiwi, M.Si. selaku Ketua Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA.
8. Ibu Ni Putu Ermi Hikmawanti, M.Farm. selaku pembimbing I dan ibu apt. Agustin Yumita, M.Si. selaku pembimbing II yang telah banyak membantu dan mengarahkan penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.
9. Indah, Halisa dan Meyra selaku rekan penelitian dan sahabat yang telah menemani suka-duka penelitian. Terima kasih kepada teman-teman yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang secara langsung maupun tidak langsung telah memberikan bantuan dan dorongan semangat selama penelitian.
10. Pimpinan dan seluruh staf kesekretariatan yang telah membantu segala administrasi yang berkaitan dengan skripsi ini, serta staf Laboran Farmasi yang telah banyak membantu dalam penelitian.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan ini masih memiliki banyak kekurangan karena keterbatasan ilmu dan kemampuan penulis. Untuk itu saran dan kritik dari pembaca sangat penulis harapkan. Penulis berharap skripsi ini dapat berguna bagi semua pihak yang memerlukan.

Jakarta, 25 Januari 2024

Penulis

DAFTAR ISI

	Hlm
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
PERYANTAAAN PENULIS	x
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Permasalahan Penelitian	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Landasan Teori	5
1. Klasifikasi Daun Beluntas (<i>Pluchea indica</i> (L) Less.)	5
2. Ekstraksi	6
3. Pelarut	7
4. Pengujian Toksisitas	8
5. <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	9
6. <i>Artemia salina</i> Leach	10
B. Kerangka Berfikir	12
C. Hipotesis	12
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	13
A. Tempat dan Jadwal Penelitian	13
1. Tempat Penelitian	13
2. Jadwal Penelitian	13
B. Alat dan Bahan Penelitian	13
1. Alat	13
2. Bahan	13
C. Prosedur Penelitian	13
1. Pengumpulan Bahan Baku Simplisia	13
2. Determinasi Tanaman	14
3. Pembuatan Serbuk Simplisia	14
4. Pembuatan Pelarut NADES	14
5. Pembuatan Ekstrak NADES	15
6. Penapisan Fitokimia	15
7. Pengujian Toksisitas Awal Metode BSLT	16
D. Analisis Data	18
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	19
A. Hasil Identifikasi Tanaman	19
B. Pelarut NADES	19
C. Karakteristik Pelarut NADES	20
D. Ekstrak NADES	20
E. Karakteristik Ekstrak NADES	21

F. Penapisan Fitokimia Ekstrak	21
G. Hasil Uji Toksisitas Awal Pelarut dan Ekstrak NADES Daun Beluntas	24
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	30
A. Simpulan	30
B. Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	38



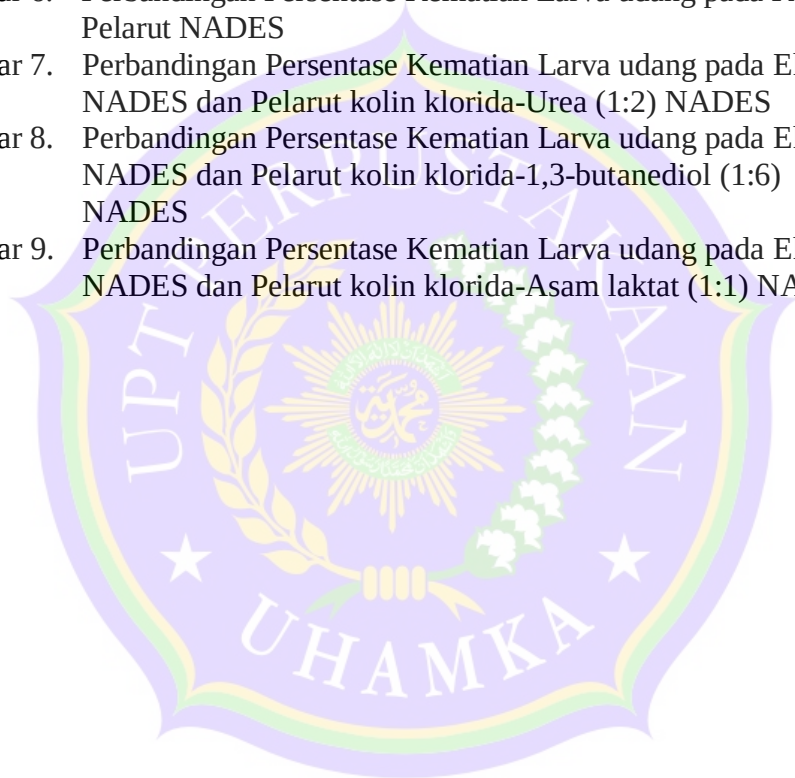
DAFTAR TABEL

	Hlm
Tabel 1. Tingkat Toksisitas Terhadap Senyawa	10
Tabel 2. Rasio Molar dan Bobot yang Ditimbang Untuk Membuat Pelarut NADES pada Penelitian Ini	15
Tabel 3. Prosedur Penapisan Fitokimia	16
Tabel 4. Variasi Konsetrasi Ekstrak dan Pelarut NADES yang digunakan dalam penelitian ini	17
Tabel 5. Uji Organoleptis Pelarut NADES pada Penelitian Ini	20
Tabel 6. Uji Organoleptis Ekstrak NADES pada Penelitian Ini	21
Tabel 7. Penapisan Fitokimia Ekstrak Daun Beluntas	22



DAFTAR GAMBAR

	Hlm
Gambar 1. (a) Tanaman Beluntas, (b) Pucuk Daun Beluntas dan (c) Panjang dan Lebar Daun Beluntas	5
Gambar 2. Sirklus Perkembangan <i>Artemia salina</i>	11
Gambar 3. Pelarut NADES Berbasis Kolin Klorida pada Penelitian Ini A.kolin klorida-urea (1:2), B.kolin klorida-asam laktat (1:1), C.kolin klorida-1,3-butanediol (1:6)	19
Gambar 4. Ekstrak NADES Daun Beluntas pada Penelitian Ini A.ekstrak kolin klorida-urea (1:2), B.ekstrak kolin klorida-asam laktat (1:1), C.ekstrak kolin klorida-1,3-butanediol (1:6)	21
Gambar 5. Perbandingan Persentase Kematian Larva udang pada Ketiga Ekstrak NADES	24
Gambar 6. Perbandingan Persentase Kematian Larva udang pada Ketiga Pelarut NADES	25
Gambar 7. Perbandingan Persentase Kematian Larva udang pada Ekstrak NADES dan Pelarut kolin klorida-Urea (1:2) NADES	26
Gambar 8. Perbandingan Persentase Kematian Larva udang pada Ekstrak NADES dan Pelarut kolin klorida-1,3-butanediol (1:6) NADES	28
Gambar 9. Perbandingan Persentase Kematian Larva udang pada Ekstrak NADES dan Pelarut kolin klorida-Asam laktat (1:1) NADES	28



DAFTAR LAMPIRAN

	Hlm
Lampiran 1. Hasil Determinasi Daun Beluntas	38
Lampiran 2. Skema Kerja	39
Lampiran 3. Prosedur Pembuatan Simplisia Daun Beluntas	40
Lampiran 4. Perhitungan Bahan Pelarut NADES	42
Lampiran 5. Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak NADES Daun Beluntas	44
Lampiran 6. Data yang Diperoleh dan Pengujian BSLT	48
Lampiran 7. Dokumentasi	49



PERNYATAAN PENULIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : **LATHIFAH AS'AD DZULNIA SEKAR**

NIM : **1904015156**

Dengan ini menyatakan bahwa hasil penelitian dalam skripsi ini **BEBAS dari unsur PLAGIARISME**. Apabila di kemudian hari ternyata pernyataan ini tidak benar maka dengan ini saya sebagai penulis naskah skripsi ini bersedia mendapatkan sanksi akademik sesuai ketentuan yang berlaku di UHAMKA

Jakarta, 26 Januari 2024

Penulis



Lathifah As'ad Dzulnia Sekar



BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tanaman beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) merupakan salah satu tanaman obat Indonesia. Bagian dari tanaman beluntas seperti akar, batang, daun, bunga, kulit, dan buah digunakan sebagai obat tradisional (Safitri *et al.*, 2018). Daun beluntas menunjukkan berbagai sifat biologis, yaitu sebagai antiinflamasi (Roslida *et al.*, 2008), antikanker (Cho *et al.*, 2012), antioksidan, anti-amuba, dan antimikroba (Sibarani *et al.*, 2013). Tanaman beluntas berkhasiat sebagai obat penurun panas, bau badan, bau mulut, pegal linu, keputihan, nyeri pinggang, pinggul, rematik, sakit perut, nyeri haid, dan gangguan cerna pada anak (Fitriansyah & Indradi, 2018).

Kandungan kimia dari daun beluntas adalah alkaloid, flavonoid, tanin, minyak atsiri, asam klorogenik, natrium, kalium, magnesium, dan fosfor, sedangkan akarnya mengandung flavonoid dan tanin (Agoes, 2010). Menurut penelitian Utomo *et al.*, (2023) bahwa komponen target yang sering kali diekstraksi dari daun beluntas salah satunya flavonoid dengan menggunakan pelarut etanol, etil asetat, atau *n*-heksana. Namun, adanya isu toksisitas dari jenis pelarut organik yang digunakan dan kadar sisa pelarut organik yang mungkin saja masih tertinggal dalam ekstrak menjadi titik kritis dalam hal toksisitasnya ketika dikonsumsi. Menurut Rizki (2021), kelemahan dari pelarut organik dalam proses ekstraksi yaitu toksisitasnya tinggi, biodegradibilitasnya yang buruk, mudah terbakar dan biaya tinggi. Sehingga diperlukan alternatif pelarut, yang lebih relatif aman, ramah lingkungan, dan dapat terurai secara hayati, salah satunya adalah *natural deep eutetic solvent* (NADES).

NADES adalah salah satu *green solvent* (pelarut hijau) yang dipilih sebagai pelarut alternatif dalam ekstraksi senyawa bioaktif. Pelarut ini dibuat dari senyawa-senyawa metabolit primer yang aman seperti asam amino, kolin klorida, urea, gliserol, asam laktat, 1,3-butanediol dan lain-lain dengan perbandingan rasio molar tertentu. Ada beberapa jenis NADES yang berhasil digunakan dalam ekstraksi komponen kimia, antara lain kolin klorida-urea, kolin klorida-asam

laktat dan kolin klorida-1,3 butanediol (Hikmawanti *et al.*, 2021). Ada beberapa keuntungan NADES sebagai pelarut, meliputi biaya pembuatannya rendah, memiliki tekanan uap rendah, tidak mudah terbakar, *biodegradable*, ramah lingkungan dan berpotensi sebagai pelarut untuk berbagai zat terlarut (Hikmawanti *et al.*, 2021). NADES sebagai pelarut pengeksrak dapat meningkatkan kelarutan dan bioaktivitas senyawa tersebut dibandingkan pelarut konvensional. Sebagai pelarut pengeksraksi, NADES memiliki dua mekanisme kerja yaitu, (1) aksi langsung (berinteraksi dengan senyawa target, biasanya melalui ikatan hidrogen) dan (2) aksi tidak langsung (merusak dinding sel, melepaskan senyawa target dari matriks tanaman) (Kalhor & Ghandi, 2019). Kolin klorida-urea (1:2) terbukti mampu mengeksraksi senyawa fenolik cukup tinggi (Syarifah *et al.*, 2022). Pada tanaman *Lavandula pedunculata* menggunakan pelarut NADES kolin klorida-urea (1:2) mendapatkan hasil $56,00 \pm 0,77$ mgGAE/g (Mansinhos *et al.*, 2021). Untuk pelarut kolin klorida-asam laktat (1:1) diperoleh mampu mengeksraksi senyawa kurkumin *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorriza*, dan *Curcuma mangga* yang menghasilkan rendemen masing-masing 2,056 dan 31,322 mg/g (Rosarina *et al.*, 2022). Kolin klorida-1,3-butanediol (1:6) mampu mengeksraksi senyawa asam klorogenat dari $26,07 \pm 1,25$ mg/g (Peng *et al.*, 2016). Aktivitas antioksidan ditunjukkan melalui penghambatan peroksidasi lipid pada homogenat hati tikus ekstrak kolin klorida-urea (1:2), kolin klorida-asam laktat (1:1), dan kolin klorida-1,3 butanediol (1:6) dari daun beluntas. Ekstrak kolin klorida-urea (1:2) daun beluntas dengan konsentrasi 12,5% (v/v) mampu menghambat peroksidasi lipid sebesar $22,55 \pm 0,12\%$ (Zikriyah, 2023). Ekstrak kolin klorida-asam laktat (1:1) daun beluntas pada konsentrasi 12,5% v/v menghambat peroksidasi lipid sebesar $15,33 \pm 1,09\%$ (Fitriyani, 2023). Ekstrak kolin klorida-1,3-butanediol (1:6) daun beluntas pada konsentrasi 12,5% (v/v) menghambat peroksidasi lipid sebanyak $8,81 \pm 0,90\%$ (Mulyati, 2023).

Meskipun punya keunggulan dalam ekstraksi, namun toksisitas dari NADES sebagai pelarut alternatif untuk ekstraksi masih perlu dipelajari. Uji toksisitas merupakan pengujian untuk mendeteksi tingkat racun dari suatu senyawa kimia, baik ekstrak ataupun fraksi dan isolat tanaman pada hewan uji dengan melihat jumlah kematian pada hewan uji. Salah satu langkah awal untuk uji toksisitas

adalah dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT diusulkan sebagai *bioassay* sederhana untuk memonitor adanya aktivitas farmakologis dari suatu ekstrak bahan alam. Larva udang dapat menjadi model hewan coba untuk deteksi toksisitas senyawa terhadap lingkungan perairan (Bustos-Obregon & Vargas, 2010). Metode ini memiliki beberapa kelebihan, yaitu cepat, sampel yang dibutuhkan relatif sedikit, dan sederhana (Susilowati, 2017). Senyawa kimia dianggap sangat toksik jika memiliki nilai LC_{50} di bawah 30 ppm, toksik jika LC_{50} 30-1000 ppm, dan tidak toksik jika nilai LC_{50} di atas 1000 ppm (Andini *et al.*, 2021). Penelitian Padua *et al.* (2018) dengan metode BSLT dari ekstrak etanol daun beluntas menunjukkan LC_{50} masing-masing sebesar 80,33 ppm. Penelitian Ratu *et al.* (2018) dengan metode BSLT dari ekstrak *n*-heksana daun beluntas menunjukkan LC_{50} sebesar 57,45 ppm.

Dengan demikian, melalui penelitian ini akan diukur toksisitas awal dari tiap ekstrak daun beluntas yang diekstraksi dengan NADES yang dibuat dari komponen kolin klorida sebagai (*hydrogen bond acceptor*) HBA dan asam laktat, urea dan 1,3 butanediol sebagai (*hydrogen bond donor*) HBD. Selain itu, evaluasi toksisitas juga dilakukan terhadap pelarut NADES, yaitu kolin klorida-urea (1:2), kolin klorida-asam laktat (1:1), dan kolin klorida-1,3 butanediol (1:6). Toksisitas diukur berdasarkan persentase kematian larva udang setelah diberikan perlakuan bahannya selama 24 jam.

B. Permasalahan Penelitian

Isu keamanan NADES sebagai pelarut yang ramah lingkungan masih perlu dipelajari. Efek toksisitasnya terhadap makhluk hidup di perairan dapat dievaluasi dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Dengan demikian, dapat dirumuskan permasalahan penelitian, yaitu apakah variasi konsentrasi tiga ekstrak NADES berbasis kolin klorida daun beluntas dan masing-masing pelarutnya berpengaruh terhadap kematian larva udang.

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui pengaruh variasi konsentrasi ekstrak NADES berbasis kolin klorida, yaitu kolin klorida-urea (1:2), kolin klorida-asam laktat (1:1), dan kolin klorida-1,3 butanediol (1:6) daun beluntas terhadap kematian larva udang.

2. Mengetahui pengaruh variasi konsentrasi pelarut NADES berbasis kolin klorida, yaitu kolin klorida-urea (1:2), kolin klorida-asam laktat (1:1), dan kolin klorida-1,3 butanediol (1:6) terhadap kematian larva udang.
3. Membandingkan pengaruh variasi konsentrasi ekstrak NADES berbasis kolin klorida, yaitu kolin klorida-urea (1:2), kolin klorida-asam laktat (1:1), dan kolin klorida-1,3 butanediol (1:6) beserta pelarutnya terhadap kematian larva udang.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan kepada masyarakat terkait ekstrak NADES tanaman daun beluntas yang berpotensi sebagai tanaman obat.



DAFTAR PUSTAKA

- Afandi, F., Siregar, V.O. and Ahmad, I. (2021). "Uji Toksisitas Ekstrak Berbasis Nades dari Daun Kadamba (*Mitragyna speciosa* Korth.) terhadap Mencit (*Mus musculus*)," *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 14, pp. 190–195. Available at: <https://doi.org/10.25026/mpc.v14i1.555>.
- Agoes, A. (2010). *Tanaman Obat Indonesia*, Salemba Medika Jakarta. Jakarta: Salemba Medika. Hlm. 11-14.
- Agustina, W., Handayani, D. and Nurhamidah. (2017). "Berapa Fraksi dari Kulit Batang Jarak (*Ricinus communis* L.)," *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*, 1(2), pp. 117–122.
- Amoroso, R., Hollmann, F. and Maccallini, C. (2021). "Choline chloride-based DES as solvents/catalysts/chemical donors in pharmaceutical synthesis," *Molecules*, 26(20). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26206286>.
- Andini, A., Prayekti, E., Triasmoro, F., dan Kamaliyah, I. N. (2021). "Pengaruh Penggunaan Jenis Pelarut dalam Uji Sitotoksistas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) pada Wound Dressing Kolagen-Kitosan," *al-Kimiya*, 8(1), pp. 15–20. Available at: <https://doi.org/10.15575/ak.v8i1.10277>.
- Banti, C.N. and Hadjikakou, S.K. (2021). "Evaluation of toxicity with brine shrimp assay," *Bio-protocol*, 11(2), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3895>.
- Bustos-Obregon, E. and Vargas, Á. (2010). "Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon," *Biological Research*, 43(3), pp. 357–362. Available at: <https://doi.org/10.4067/S0716-97602010000300013>.
- Cannavacciuolo, C., Pagliari, S., Frigerio, J., Giustra, C. M., Labra, M., and Campone, L. (2023). "Natural Deep Eutectic Solvents (NADESs) Combined with Sustainable Extraction Techniques: A Review of the Green Chemistry Approach in Food Analysis," *Foods*, 12(1). Available at: <https://doi.org/10.3390/foods12010056>.
- Cao, J., Cao, J., Wang, H., Chen, L., Cao, F., and Su, E. (2020). "Solubility improvement of phytochemicals using (natural) deep eutectic solvents and their bioactivity evaluation," *Journal of Molecular Liquids*, 318, p. 113997. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113997>.
- Cho, J.J., Cho, C. L., Kao, C. L., Chen, C. M., Tseng, C. N., Lee, Y. Z., Liao, L. J., and Hong, Y. R. (2012). "Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction

of p53-dependent cell death,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12. Available at: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-265>.

- Choi, Y.H., Spronsen, J. V., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W.C.E., Witkamp, G. J., & Verpoorte, R. (2011). “Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?,” *Plant Physiology*, 156(4), pp. 1701–1705. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.111.178426>.
- Craveiro, R., Aroso, I., Flammia, V., Carvalho, T., Viciosa, M. T., Dionísio, M., Barreiros, S., Reis, R. L., Duarte, A. R.C., Paiva, A. (2016). “Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents,” *Journal of Molecular Liquids*, 215, pp. 534–540. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.01.038>.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, Geert-J., Verpoorte, R., Choi, Y. H. (2013). “Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology,” *Analytica Chimica Acta*, 766(2010), pp. 61–68. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>.
- Dave, G., Blanck, H. and Gustafsson, K. (1979). “Biological effects of solvent extraction chemicals on aquatic organisms,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 29(4), pp. 249–257. Available at: <https://doi.org/10.1002/jctb.503290406>.
- DeSilva, C. and Verlencar, X.N. (1974). “Toxicity Biossay of Urea on Two Fishes,” *National Institute of Oceanography, Dona Paula, Goa (India)*, 7, pp. 177–182.
- Departemen Kesehatan RI. (2020). *Farmakope Indonesia Edisi VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm. 48.
- Dessy, M.E. and Rahmawati, B. (2020). “Formulasi Krim Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Sebagai Sediaan Pelindung Sinar Ultraviolet,” *Jurnal Keperawatan dan Kesehatan Masyarakat*, 9(2), pp. 109–119.
- Fadli, Suhaimi and Idris, M. (2019). “Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*),” *Medical Sains*, 4(1), pp. 35–42.
- Fajrin, F.I. and Susila, I. (2019). Uji Fitokimia Ekstrak Kulit Petai Menggunakan Metode Maserasi. Dalam: *Prosiding Seminar Nasional Teknologi dan Sains (SNasTekS)*, Jakarta.
- Fardiaz, M.A. Fardiaz, M. A., Az-Zahro, K. N., Dzulqaidah, I., Savitri, D. A., Pratama, I. S., dan Hidayat, L. H. (2023). “Acute Toxicity Test of The Jamu Turmeric Tamarind on *Artemia salina* Leach Larvae,” *Jurnal*

Biologi Tropis, 23(3), pp. 263–269. Available at: <https://doi.org/10.29303/jbt.v23i3.4900>.

- Fitriansyah, M.I. and Indradi, R.B. (2018). “Review: Profil Fitokimia Dan Aktivitas Farmakologi Baluntas (*Pluchea indica* L.),” *Farmaka*, 16(2), pp. 337–346.
- Fitriyani, A.N. (2023). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kolin Klorida-Asam Laktat (1:1) Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) Pada Homogenat Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA, Jakarta. Hlm. 29-43.
- Furqoni, D.A. (2021). Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) Hasil Ekstraksi Ultrasonik Dengan Variasi Pelarut. *Skripsi*. Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universi. Hlm 44.
- Hadijannah, S. (2018). Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Bidari (*Ziziphus mauritiana*) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach) Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Fakultas Farmasi dan Kesehatan Institut Kesehatan Helvetia.
- Hamrun, N. Nabilah, T., Hasyim, R., Ruslin, M., Dammar, I., Anugrah, M. (2020). “Toxicity test of bioactive red alga extract *Eucheuma spinosum* on shrimp *Artemia salina* Leach,” *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(5), pp. 672–676. Available at: <https://doi.org/10.31838/srp.2020.5.94>.
- Hanani, E. (2016). *Analisis Fitokimia*. Jakarta : Buku Kedokteran EGC.
- Hikmawanti, N.P.E. Ramadan, D., Jantan, I., and Mun'im, A. (2021). “Natural deep eutectic solvents (Nades): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development,” *Plants*. MDPI. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants10102091>.
- Ivanović, M., Grujić, D., Cerar, J., Razboršek, M. I., Topalić-Trivunović, L., Savić, A., Kočar, D., and Kolar, M. (2022). “Extraction of Bioactive Metabolites from *Achillea millefolium* L. with Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents: A Study of the Antioxidant and Antimicrobial Activity,” *Antioxidants*, 11(4). Available at: <https://doi.org/10.3390/antiox11040724>.
- Kalhor, P. and Ghandi, K. (2019). “Deep eutectic solvents for pretreatment, extraction, and catalysis of biomass and food waste,” *Molecules*, 24(22). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules24224012>.
- Kongkiatpaiboon, S., Chewchinda, S. and Vongsak, B. (2018). “Optimization of extraction method and HPLC analysis of six caffeoylquinic acids in *Pluchea indica* leaves from different provenances in Thailand,” *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(2), pp. 145–150.

- Leron, R.B., Soriano, A.N. and Li, M.H. (2012). "Densities and refractive indices of the deep eutectic solvents (choline chloride+ethylene glycol or glycerol) and their aqueous mixtures at the temperature ranging from 298.15 to 333.15K," *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(4), pp. 551–557. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.01.007>.
- Manongko, P.S., Sangi, M.S. and Momuat, L.I. (2020). "Phytochemical Compound Test and Antioxidant Activity of Broken Bone Plants (*Euphorbia tirucalli* L.)," *Jurnal MIPA*, 9(2), p. 64.
- Mansinhos, I., Gonçalves, S., Rodríguez-Solana, R., Luis Ordóñez-Díaz, J., Manuel Moreno-Rojas, J., Romano, A., and Barba, F. J., (2021). "Ultrasonic-Assisted Extraction and Natural Deep Eutectic Solvents Combination: A Green Strategy to Improve the Recovery of Phenolic Compounds from *Lavandula pedunculata* subsp. *lusitanica* (Chaytor) Franco," *Antioxidants*, 10(4), p. 582.
- Marliza, H. and Oktaviani, D. (2021). "Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Kemunu (*Colacasia gigantea* Hook.f) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)," *Bencoolen Journal Of Pharmacy*, 1(1), pp. 38–45.
- Mudjiman, A. (1988). "*Udang Renik Air Asin (Artemia salina)*. Jakarta : Bhartara Karya Aksara; Hlm. 3–4, 14–15.
- Mulyati, R. (2023). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kolin Klorida-1,3-Butanediol (1:6) Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) Pada Homogenat Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA, Jakarta. Hlm. 28-41.
- Murador, D.C., de Souza Mesquita, L. M., Vannuchi, N., Braga, A. R. C., de Rosso, V. V. (2019). "Bioavailability and biological effects of bioactive compounds extracted with natural deep eutectic solvents and ionic liquids: advantages over conventional organic solvents," *Current Opinion in Food Science*, 26, pp. 25–34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.002>.
- Nafisah, M. and Tukiran, D. (2017). "Uji Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Aktif dari Ekstrak Kloroform Daun Tanaman Beluntas (*Pluchea indica* L.)," *UNESA Journal of Chemistry*, 6(2), pp. 107–112.
- Nofitarini, R., Novita, S. F., dan Hidayah, F. Nur. (2019). "Uji Kualitatif Alkaloid Dan Tannin Ekstrak Kulit Bawang Dan Daun Ketapang Dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik,"
- Noviyanty, Y., Hepiyansori and Agustian, Y. (2020). "Identifikasi dan Penetapan Kadar Senyawa Tanin Pada Ekstrak Daun Biduri (*Calotropis gigantea*) metode Spektrofotometri UV-Vis," *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 6(1), pp. 57–64.

- Padua Ratu and Antonius. (2018). Uji Toksisitas Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less), Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.), Kulit Biji Jengkol (*Archidendron pauciflorum*) dan Kulit Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) Dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*. Vol. IV, No. 2
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., and Duarte, A. R. C. (2014). "Natural deep eutectic solvents - solvents for the 21st century," *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(5), pp. 1063–1071. Available at: <https://doi.org/10.1021/sc500096j>.
- Peng, X., Duan, M. H., Yao, X. H., Zhang, Y. H., Zhao, C. J., Zu, Y. G., Fu, Y. J.. (2016). "Green extraction of five target phenolic acids from *Lonicerae japonicae* Flos with deep eutectic solvent," *Separation and Purification Technology*, 157, pp. 249–257. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.065>.
- Priyanto. (2018). *Toksikologi : Mekanisme, Terapi Antidotum, dan Penilaian Risiko* (4th ed.). Jawa Barat : LESKONFI; Hlm 60-181.
- Purboyati, K. (2013). Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less) Terhadap Pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Purwokerto. Hlm. 5-16.
- Rahman, F., Laksono, T. E., Samudro, G., Priyambada, I. B. (2012). "Penggunaan Nilai EC, GI, dan DOM pada Penentuan Kompos Matang dan Stabil Diperkaya," 10, pp. 8–14.
- Rizki, I.F. (2021). "Pengembangan Metode Ekstraksi Fitonutrien Crude Palm Oil (Cpo) Ramah Lingkungan Untuk Industri Pangan Dan Farmasi," *WARTA Pusat Penelitian Kelapa Sawit*, 26(3), pp. 132–141. Available at: <https://doi.org/10.22302/iopri.war.warta.v26i3.57>.
- Rosarina, D., Narawangsa, D. R., Chandra, N. S. R., Sari, E.ermansyah, Heri (2022). "Optimization of Ultrasonic—Assisted Extraction (UAE) Method Using Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) to Increase *Curcuminoid* Yield from *Curcuma longa* L., *Curcuma xanthorrhiza*, and *Curcuma mangga* Val.," *Molecules*, 27(18). Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27186080>.
- Roslida, A.H., Erazuliana, A.K. and Zuraini, A. (2008). "Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Pluchea indica* (L) less leaf," *Pharmacologyonline*, 2, pp. 349–360.
- Safitri, I., Nuria, M.C. and Puspitasari, A.D. (2018). "Perbandingan Kadar Flavonoid Dan Fenolik Total Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) Pada Berbagai Metode Ekstraksi," *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 3(1), pp. 31–36. Available at: <https://doi.org/10.31942/inteka.v3i1.2123>.

- Sangi, M. *et al.* (2008). *Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara*, *Chem. Prog.*
- Sangi, M.S., Momuat, L.I. and Kumaunang, M. (2012). “Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Tepung Gabah Pelepah Aren (*Arenga pinnata*),” *Jurnal Ilmiah Sains*, 12(2), p. 127. Available at: <https://doi.org/10.35799/jis.12.2.2012.716>.
- Sepvina, N.I., Ridwanto, R. and Rani, Z. (2019). “Uji Toksisitas Kitosan Cangkang Kerang Bulu (*Anadara an-tiquata*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT),” 7(2), pp. 380–389.
- Shaikh, J.R. and Patil, M. (2020). “Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview,” *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), pp. 603–608. Available at: <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>.
- Sibarani, V.R., Wowor, P.M. and Awaloei, H. (2013). “Uji Efek Analgesik Esktrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) pada Mencit (*Mus musculus*),” *Jurnal e-Biomedik*, 1(1), pp. 621–628. Available at: <https://doi.org/10.35790/ebm.1.1.2013.4609>.
- Subekti, N.K. (2014). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Daun Abang (*Aglaia elliptica* Blume) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Skripsi*. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Hlm. 9.
- Susilowati, F. (2017). “Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) Ekstrak Etil Asetat Spons *Calthropella* sp. Asal Zona Intertidal Pantai Krakal Gunung Kidul Yogyakarta,” *Pharmaceutical Journal of Islamic Pharmacy*, 1(1), p. 1. Available at: <https://doi.org/10.21111/pharmasipha.v1i1.1118>.
- Syarifah, A.N., Suryadi, H. and Mun'im, A. (2022). “Total Phenolic Content of Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) Extraction in Comfrey (*Symphytum officinale*),” *Jurnal Aisyah : Jurnal Ilmu Kesehatan*, 7(3), pp. 937–940.
- Triwahyuni, E. and Yusrin (2010). “Kadar Protein Kista *Artemia* Curah yang Dijual Pertambak Kota Rembang dengan Variasi Suhu Penyimpanan,” *Jurnal Unimus*, pp. 0–5. Available at: jurnal.unimus.ac.id/index.php/psn12012010/article/view/765/819.
- Utomo, Y., Chairini, N. and Asrori, M.R. (2023). “Perbandingan Metode Maserasi dan Microwave-Assisted Extraction pada Daun Beluntas dengan Variasi Pelarut dan Uji Antioksidan,” *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 9(1), pp. 23–32. Available at: <https://doi.org/10.22487/kovalen.2023.v9.i1.16155>.

- Waghulde, S., Kale, M.K. and Patil, V. (2019). "Brine Shrimp Lethality Assay of the Aqueous and Ethanolic Extracts of the Selected Species of Medicinal Plants," *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, 47(1), p. 41.
- Wahyu Ningdyah, A., Hairil Alimuddin, A. and Jayuska, A. (2015). "Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*)," 4(1), pp. 75–83.
- Zhang, H., Yang, Y. fei and Zhou, Z. qin (2018). "Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods," *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), pp. 256–263. Available at: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61664-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61664-2).
- Zhao, Q., Luan, X., Zheng, M., Tian, X. H., Zhao, J., Zhang, W. D., Ma, B., L. (2020). "Synergistic mechanisms of constituents in herbal extracts during intestinal absorption: Focus on natural occurring nanoparticles," *Pharmaceutics*, 12(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020128>.
- Zikriyah, L. (2023). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kolin Klorida-Urea (1:2) Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less) Pada Homogenat Hati Tikus Putih Jantan Galur Wistar. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. HAMKA, Jakarta. Hlm. 30-42.