

**UJI TOKSISITAS SEDIAAN *TEH BAG* DAUN BINAHONG (*Anredera*
Cordifolia (Ten) Steenis) DENGAN METODE *BRINE SHRIMP*
LETHALITY TEST (BSLT) DENGAN MENGGUNAKAN
LARVA UDANG (*Artemia salina* Leach)**

Proposal Skripsi

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat

Untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi (S.Farm)



Disusun Oleh :

FITRIZA OKTAVIANI 21142074

YAYASAN AL FATHAH

PROGRAM STUDI S1 FARMASI KLINIS DAN KOMUNITAS

SEKOLAH TINGGI KESEHATAN

AL-FATAH BENGKULU

2024

KATA PENGANTAR

Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyusun PROPOSAL yang berjudul “UJI TOKSISITAS SEDIAAN *TEH BAG DAUN BINAHONG* (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis) DENGAN METODE *BRINE SHRIMP LETHALITY TEST* (BSLT) DENGAN MENGGUNAKAN LARVA UDANG (*Artemia salina* Leach)”. tepat pada waktunya. Proposal ini di susun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan S1 Farmasi Klinis & Komunitas di Sekolah Tinggi Kesehatan Al-Fatah Bengkulu. Ucapan terima kasih yang terbesar penulis persembahkan kepada kedua orang tua, karena dengan doa dan kasih sayangnya telah mengiringi perjalanan penulis dalam penyusunan proposal. Penulis juga ingin mengucapkan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya atas bantuan dan dukungannya kepada:

1. Ibu Gina Lestari, M.Farm., Apt selaku pembimbing pertama yang telah memberi waktu dan bimbingannya.
2. Ibu Devi Novia, M.Farm., Apt selaku pembimbing kedua yang telah memberi waktu dan bimbingannya.
3. Bapak Drs. Djoko Triyono, Apt., MM selaku ketua yayasan Al-Fatah Bengkulu.
4. Ibu Yuska Noviyanty, M.Farm., Apt selaku Ketua STIKES Farmasi Al-fatah Bengkulu.
5. Para dosen dan staf karyawan STIKES Farmasi Al-Fatah Bengkulu yang telah memberikan ilmu pengetahuan kepada penulis.

6. Rekan-rekan seangkatan di STIKES Farmasi Al-Fatah Bengkulu dan
7. Semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikannya Proposal Skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa Proposal ini masih banyak terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun. Akhir kata penulis berharap semoga Proposal yang penulis susun ini dapat memberikan manfaat untuk pembangunan ilmu pengetahuan khususnya tentang farmasi dan bagi pembaca sekalian

Bengkulu, 21 Februari 2024

Fitriza Oktaviani

DAFTAR ISI

JUDUL	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL	vii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Batasan Masalah.....	4
1.3 Rumusan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Kajian Teori.....	7
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Daun Binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten) Steenis)	7
2.1.2 Simplisia	14
2.1.3 Teh Daun binahong.....	16
2.1.4 Prosedur pembuatan Teh Daun Binahong	18
2.1.5 Toksisitas	19
2.1.6 Jenis jenis Metode Toksisitas	21
2.1.7 Metode Uji Toksisitas (<i>Simple Bench Top Biassays</i>)	23
2.1.8 Hewan Percobaan	25
2.1.9 Cairan Pelarut	29
2.1.10Kromatografi Lapis Tipis.....	30
2.2 Kerangka Konsep	33
BAB III METODE PENELITIAN	34
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	34
3.2. Alat dan Bahan	34
3.2.1. Alat	34
3.2.2. Bahan	34
3.3. Prosedur Kerja Penelitian.....	35

3.3.1. Verifikasi tanaman Binahong (<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis)	35
3.3.2. Pengambilan sampel	35
3.3.3. Pengelolaan sampel.....	35
3.3.4. Evaluasi simplisia	35
3.4. Pelaksanaan Penelitian	36
3.5. Prosedur Kerja Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	41
3.6. Analisis Data	44
DAFTAR PUSTAKA	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Daun Binahong	8
Gambar 2. Sktruktur Senyawa Alkaloid	12
Gambar 3. Sktruktur Senyawa Flavonoid	12
Gambar 4. Sktruktur Senyawa Saponin	13
Gambar 5. Kerangka Konsep	25

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kategori toksisitas berdasarkan nilai LC_{50}	21
--	----

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Binahong merupakan tanaman menjalar yang bersifat perenial (berumur lama). binahong mempunyai nama lain diantaranya : *Boussingaultia cordifolia* (Ten), *Boussingaultia gracilis* Miers, *madeira vine* (Inggris), *dheng san chi* (Cina), gondola (Indonesia). Binahong bisa mencapai panjang hingga 5 meter (Sari, 2019).

Menurut penelitian (Jazilah, 2014). uji fitokimia pada ekstrak etanol daun binahong menunjukkan keberadaan senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tannin, triterpeoid/steroid dan saponin.

Uji toksisitas merupakan uji untuk mengamati aktivitas farmakologi suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat setelah terpapar atau pemberian dalam dosis tertentu. Prinsip uji toksisitas yaitu bahwa komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah. Larva udang memiliki kulit yang tipis dan peka terhadap lingkungannya sehingga banyak digunakan dalam uji toksisitas. Zat atau senyawa asing yang ada di lingkungan akan terserap ke dalam tubuh secara difusi dan langsung memengaruhi kehidupannya. Larva udang yang sensitif ini akan mati apabila zat atau senyawa asing tersebut bersifat toksik (Jelita dkk, 2020).

Menurut penelitian (Jazilah, 2014). masing-masing ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) memiliki tingkat toksisitas

terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, ditunjukkan dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm. Tingkat toksisitas ekstrak etanol $>$ ekstrak etil asetat $>$ ekstrak n-heksana yaitu dengan nilai LC_{50} sebesar 7,35702 ppm, 106,992 ppm dan 175,800 ppm. Hasil uji pendahuluan dengan metode BSLT menunjukkan dalam ketiga variasi ekstrak pelarut daun binahong memiliki potensi bioaktivitas, sehingga perlu dilakukan pengujian bioaktivitas lebih lanjut terhadap tanaman ini.

Menurut penelitian (Ayu dkk, 2018). Ekstrak etanol daun binahong (*Androdera cordifolia* (Ten.) Steenis) memiliki potensi toksisitas dengan nilai LC_{50} sebesar 97, 797 $\mu\text{g/mL}$. 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.

Menurut penelitian (Lestari, 2022). berdasarkan data statistik hasil penelitian, diketahui bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* yang didapat hasil nilai signifikan ($P < 0,05$), hal ini menunjukkan bahwa daun binahong dapat menurunkan kadar asam urat.

Penelitian ini dilakukan dengan membuat sediaan teh bag daun binahong, sediaan teh bag yang diperoleh digunakan untuk uji toksisitas terhadap larva udang dengan metode BSLT dan uji fitokimia dengan reagen. Data kematian *Artemia salina* dianalisis dengan analisis probit untuk mengetahui nilai dosis atau konsentrasi yang diberikan sekali (tunggal) atau

beberapa kali dalam 24 jam dari suatu hewan yang secara statistik diharapkan dapat mematikan 50% hewan coba (LC_{50}). Hasil dari penelitian menunjukkan pada masing-masing sediaan teh bag daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) memiliki tingkat toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach, ditunjukkan dengan nilai LC_{50} s 1000 ppm. Tingkat toksisitas sediaan teh bag, yaitu dengan nilai LC_{50} sebesar 7,35702 ppm. Pada sediaan teh bag dilakukan uji fitokimia dengan reagen yaitu adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid/steroid dan saponin. Golongan senyawa-senyawa tersebut yang menunjukkan adanya potensi bioaktivitas terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach).

Prosedur awal untuk menentukan toksisitas akut senyawa baru adalah dengan membuat satu kisaran dosis untuk diberikan pada hewan uji. Takaran dosis yang dianjurkan paling tidak empat peringkat dosis, berkisar dari dosis terendah yang belum memberikan efek kematian seluruh hewan uji sampai dosis tertinggi yang dapat mematikan seluruh atau hampir seluruh hewan uji. Untuk menentukan LC_{50} secara tepat, perlu dipilih suatu dosis yang akan membunuh sekitar separuh jumlah hewan uji, dosis lain yang akan membunuh lebih dari separuh dan dosis ketiga yang akan membunuh kurang dari separuh dari jumlah hewan uji. Sering digunakan empat dosis atau lebih dengan harapan bahwa sekurang-kurangnya tiga dosis diantaranya akan berada dalam rentang dosis yang dikehendaki (Mustapa, 2018).

Berdasarkan fakta diatas maka penulis tertarik untuk menguji Toksisitas Sediaan *Teh Bag* Simplisia Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten)

Steenis) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan Larva Udang *Artemia Salina* Leach dan Analisis Kandungan Fitokimia pada Tanaman Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis) menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis.

1.2 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan dalam penelitian pada uji toksisitas ini menggunakan sediaan Teh Bag Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis).
2. Pengeringan simplisia Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) dengan menggunakan Oven pada suhu 50°C.
3. Metode pada uji toksisitas sediaan Teh Bag Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) ialah menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan Larva Udang (*Artemia salina* Leach).
4. Pengujian analisis Fitokimia dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

1.3 Rumusan Masalah

1. Pada Nilai berapakah untuk dapat mengetahui sediaan Teh Bag Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) dikatakan Toksisitas dari Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) ?
2. Golongan senyawa apa yang terdapat dalam sediaan Teh Bag Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) yang dapat menyebabkan terjadinya Toksisitas ?

1.4 Tujuan Penelitian

1. Untuk Mengetahui pada nilai berapa sediaan Teh Bag daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) dapat dikatakan Toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.
2. Untuk Mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam sediaan Teh Bag daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) yang dapat menyebabkan Toksisitas.

1.5 Manfaat Penelitian

a. Manfaat Bagi Masyarakat Umum

Hasil penelitian ini diharapkan agar dapat dijadikan salah satu sumber informasi dan dapat memberikan masukan yang bermanfaat serta dapat menjadi bahan acuan bagi peneliti selanjutnya dan Memberikan informasi pada masyarakat tentang manfaat daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) sebagai alternatif pengobatan.

b. Manfaat Bagi Akademik

Menambah pengetahuan bagi mahasiswa untuk membacanya dan dapat dijadikan referensi untuk dapat melakukan penelitian selanjutnya dan menambah literatur perpustakaan Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Al-Fatah Kota Bengkulu.

c. Manfaat Bagi Peneliti

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai Toksisitas daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) sebagai masukan bagi peneliti lain.
2. Untuk dapat memberikan informasi mengenai golongan senyawa aktif yang terkandung dalam daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) dan pemanfaatannya sebagai alternatif pengobatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kajian Teori

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis)



Gambar 1. Daun Binahong

a. Klasifikasi

Klasifikasi tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) (Taek, 2018). yaitu :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Caryophyllales</i>
Family	: <i>Bassellaceae</i>
Genus	: <i>Anredera</i>
Spesies	: <i>Anredera Cordifolia</i> (Ten.) Steenis

b. Morfologi

Tanaman binahong berupa tumbuhan menjalar, berumur panjang (perennial), panjang tanaman dapat mencapai ± 5 m. Akar binahong berbentuk rimpang, berdaging lunak. Batang bertekstur lunak, berbentuk silindris, saling membelit, berwarna merah, bagian dalam solid, permukaan halus, kadang membentuk semacam umbi yang melekat di ketiak daun dengan bentuk tak beraturan dan bertekstur kasar. Tipe daun binahong adalah daun tunggal, bertangkai sangat pendek (sessile), tersusun berseling, berwarna hijau, berbentuk jantung (cordata), panjang 5-10 cm, lebar 3-7 cm, helaian daun tipis lemas, ujung runcing, pangkal berlekuk (emarginatus), tepi rata, serta permukaan licin. Tipe bunga binahong adalah bunga majemuk berbentuk tandan, bertangkai panjang, muncul diketiak daun, mahkota berwarna krim keputih-putihan berjumlah lima helai berlekatan, panjang helai mahkota 0,50-100 cm, dan berbau harum. Perbanyak biji binahong secara *generative*, namun lebih sering berkembang atau dikembangkan secara *vegetative* melalui akar rimpangnya. Tumbuhan ini mudah tumbuh di daratan rendah maupun daratan tinggi. Banyak ditanam di dalam pot sebagai tanaman hias dan obat. Umumnya dikembangkan secara *generative* melalui biji, walaupun lebih diperbanyak melalui *vegetative* dengan akar rimpangnya. Umbi terdapat dipangkal batangnya. Dan bisa juga diperbanyak dengan umbi batang yang disebar di tanah. Tumbuh dengan baik di daerah tropis atau subtropis (Nurasmi, 2020).

c. Kandungan

Binahong mengandung komponen aktif yang bermanfaat memiliki banyak sifat farmakologis seperti antimikroba, anti-inflamasi, antikanker, antioksidan, antijamur, dan antitumor. Komponen aktif dalam hal ini tanaman termasuk saponin, tanin, terpenoid, alkaloid dan flavonoid. Saponin tampaknya berpengaruh pada aktivasi dan sintesis transformasi growth factor- β (TGF- β 1) dan juga pada modifikasi reseptor TGF- β 1 dan TGF- β 2 dalam fibroblast. Ini sangat penting untuk pembentukan matriks kolagen dalam binahong adalah diharapkan dapat meningkatkan tingkat penyembuhan. Kandungan kimia yang terkandung dalam Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) terdiri dari asam oleanolic, antimikroba, asam askorbat, saponin triterpenoid flavonoid, dan protein. Konten dalam binahong juga terbukti memiliki anti-inflamasi, anti-demam dan efek anti-parasit. Ini bisa menjadi pengobatan alternatif. Uji klinis pada isi daun binahong ekstrak telah dilakukan di beberapa studi, dengan isi daun binahong ekstrak, yaitu flavonoid, saponin, fenol, terpenoid, asam oleanolic, protein, asorbat asam, antimikroba. Kandungan yang berpotensi sebagai anthelmintik adanya senyawa saponin. Saponin memiliki bioaktivitas antelmintik yang dapat menyebabkan paralisis dan kematian cacing. Saponin yang terkandung bersifat toksik dan mengganggu kestabilan fisiologis cacing *Ascaridia galli*, saponin dapat berintegrasi ke dalam membran seluler dan merusak permeabilitas membran sehingga terjadi perubahan homeostasis ion antara intra- dan ekstraseluler (Nurasmi, 2020).

d. Manfaat Tanaman

Tanaman ini mempunyai banyak khasiat dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit ringan maupun berat, termasuk sebagai obat luka. Hampir semua bagian tanaman binahong seperti umbi, batang, bunga, dan daun dapat digunakan dalam terapi herbal (Nurasmi, 2020). Daun binahong dapat bersifat sebagai antibakteri, antivirus, antiinflamasi, analgesik dan antioksidan. Daun binahong berkhasiat untuk meningkatkan daya tahan tubuh terhadap infeksi dan juga memperbaiki sel yang rusak, melancarkan peredaran serta tekanan darah, mencegah stroke, mencegah resiko kanker (Hariana, 2013).

e. Skrining fitokimia

1) Definisi

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan memberi gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti. Metode skrining fitokimia dilakukan dengan pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Simaremare, 2014).

Skrining Fitokimia dibagi menjadi dua :

- a. Metabolit Primer Metabolit primer merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tanaman yang berperan sebagai sumber kelangsungan hidup tanaman Tersebut. Salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan adalah flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa golongan fenol terbesar di alam

dengan struktur dasar yang terdiri dari 15 atom karbon membentuk susunan C₆-C₃-C₆ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan tiga atom karbon yang dapat atau tidak membentuk cincin ketiga (Hany Anastasia dkk, 2016).

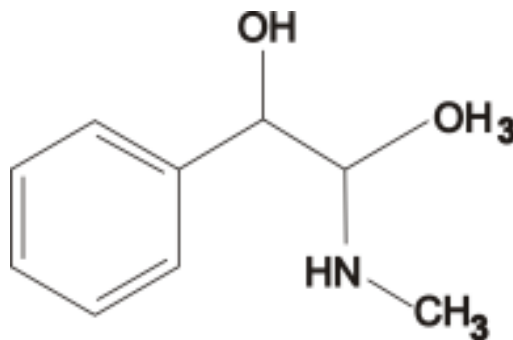
b. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa organik alami yang berasal dari tumbuhan dimana senyawa ini bertindak sebagai pelindung dari gangguan lingkungan. Senyawa ini memiliki struktur kimia yang kompleks dimana senyawa ini produk buangan (waste product) dari suatu biosintesis. Senyawa ini dapat diisolasi melalui tahapan proses seperti penghalusan, pengeringan ataupun liofilisasi buah dan sayuran dengan cara perendaman dan selanjutnya diekstrak dengan pelarut (Kumalasari dkk, 2019). Kandungan senyawa metabolit sekunder pada binahong yaitu flavonoid, terpenoid, steroid, alkaloid, fenol, dan saponin (Karim, 2017).

a) Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh senyawa alkaloida berasal dari tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Alkaloida yang ditemukan di alam mempunyai keaktifan biologis tertentu, ada yang sangat beracun dan ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan. Misalnya kina, morfin dan stiknin. Alkaloida dapat ditemukan dalam

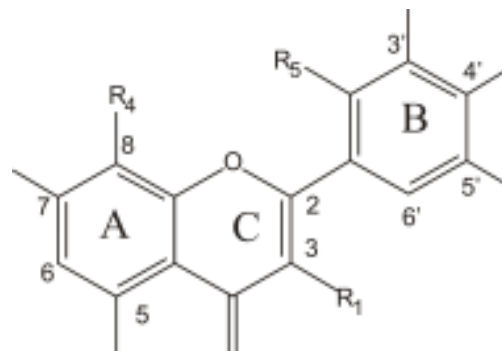
berbagai bagian tumbuhan seperti biji, daun, ranting dan kulit batang. Alkaloida 7 umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan harus dipisahkan dari campuran senyawa yang rumit yang berasal dari jaringan tumbuhan (Febrianti, 2022).



Gambar 2. Struktur Senyawa Alkaloid

b) Flavonoid

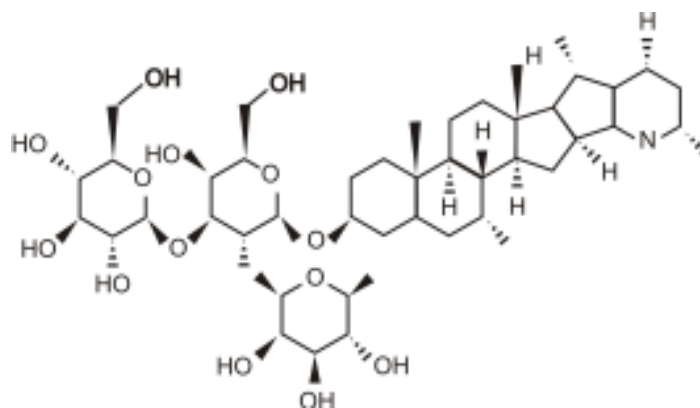
Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan didalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik. Senyawa fenol dapat mengikat protein. Keberadaan flavonoid pada daun tanaman dipengaruhi oleh proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid. Secara biologis flavonoida memainkan peranan penting dalam kaitan penyerbukan tanaman oleh serangga. Sejumlah flavonoida mempunyai rasa pahit sehingga dapat bersifat menolak sejenis ulat tertentu (Febrianti, 2022).



Gambar 3. Struktur Senyawa Flavonoid

c) Saponin

Saponin adalah jenis glikosida yang banyak ditemukan dalam tumbuhan. Saponin merupakan golongan senyawa alam yang rumit dan mempunyai masa molekul besar terdiri dari aglikon baik steroid atau triterpenoid dengan satu atau lebih rantai gula/glikosida dan berdasarkan atas sifat kimiawinya, saponin dapat dibagi dalam dua kelompok yaitu: steroid dengan 27 atom C dan triterpenoids dengan 30 atom C (Hendra Gunawan dkk, 2018).



Gambar 4. Struktur Senyawa Saponin

2.1.2 Simplisia

simplisia merupakan bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan apapun (Irwanta dkk, 2015). Simplisia terdiri dari 3 macam yaitu :

Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman (isi sel yang secara spontan keluar dari tanaman atau dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya ataupun zat-zat nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tanamannya dan belum berupa zat kimia murni (Utami dkk, 2013).

Simplisia hewani adalah simplisia yang merupakan hewan utuh, sebagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni (Utami dkk, 2013).

Simplisia pelikan atau mineral adalah simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah dengan cara yang sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Utami dkk, 2013).

Pada umumnya pembuatan simplisisa melalui tahapan seperti berikut : (Rina Wahyuni, Guswandi, 2014).

a. Pengumpulan bahan baku

Tumbuhan akan diambil secara manual, diambil semua bagian dari tumbuhan binahong yang ada di atas permukaan tanah. Tumbuhan herbal binahong diambil dari Jl Air Pauh I, Perumahan Griya Betungan Asri, Betungan Kota Bengkulu.

b. Sortasi basah

Sortasi basah dilakukan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan asing lainnya dari tumbuhan sebelum pencucian dengan cara dibuang bagian-bagian yang tidak perlu sebelum pengeringan, sehingga didapatkan herbal yang layak untuk digunakan. Cara ini dapat dilakukan secara manual.

c. Pencucian

Pencucian dilakukan untuk menghilangkan tanah dan pengotor lainnya yang melekat pada bahan tumbuhan. Pencucian dilakukan dengan air bersih, misalnya dari mata air, air sumur dan air PAM. Pencucian dilakukan sesingkat mungkin agar tidak menghilangkan zat berkhasiat dari tumbuhan tersebut.

d. Perajangan

Perajangan simplisia dilakukan untuk mempermudah proses pengeringan, pengepakan, dan penggilingan. Sebelum dirajang tumbuhan dijemur dalam keadaan utuh selama 1 hari. Perajangan ini dapat dilakukan dengan pisau, dengan alat mesin perajangan khusus sehingga diperoleh irisan tipis atau potongan dengan ukuran yang dikehendaki.

e. Pengeringan

Pengeringan dilakukan dengan 3 cara yaitu :

1. Dikering anginkan
2. Terpapar cahaya matahari

3. Dengan menggunakan oven

Pengeringan ini berlangsung hingga diperoleh kadar air $\leq 10\%$.

f. Sortasi kering

Dilakukan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan kotoran-kotoran lain yang masih ada dan tertinggal pada simplisia kering. Proses ini dilakukan secara manual.

g. Pengepakan dan penyimpanan

Selama penyimpanan ada kemungkinan terjadi kerusakan pada simplisia. Untuk itu dipilih wadah yang bersifat tidak beracun dan tidak bereaksi dengan isinya sehingga tidak menyebabkan terjadi reaksi serta penyimpangan warna, bau, rasa dan sebagainya pada simplisia. Untuk simplisia yang tidak tahan panas diperlukan wadah yang melindungi simplisia terhadap cahaya, misalnya aluminium foil, plastik atau botol yang berwarna gelap, atau kaleng dan sebagainya. Penyimpanan simplisia kering biasanya dilakukan pada suhu kamar ($150\text{ }^{\circ}\text{C}$ samapai $300\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.1.3 Teh Daun binahong

Teh herbal merupakan hasil pengolahan dari bunga, kulit, biji, daun dan akar berbagai tanaman selain tanaman *Camellia sinensis* serta memiliki khasiat dalam membantu pengobatan suatu penyakit atau sebagai minuman penyegar tubuh. Daun binahong merupakan salah satu tanaman yang berpotensi untuk dijadikan teh herbal (Lestari dkk, 2023).

Tanaman binahong merupakan salah satu tanaman obat yang berpotensi untuk dikembangkan, karena hampir semua bagian tanaman binahong seperti umbi, batang, bunga, dan daun dapat digunakan dalam terapi herbal (Eriadi dkk., 2015). Bagian tanaman yang paling sering digunakan atau dimanfaatkan untuk kesehatan atau sebagai obat adalah bagian daun. Daun binahong mengandung zat aktif dari golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenol, dan steroid (Lestari dkk, 2023). Daun binahong diketahui berpotensi sebagai antioksidan, karena salah satunya mengandung flavonoid (Amin dkk, 2013).

Dalam kehidupan masyarakat, biasanya daun binahong diolah dengan cara merebusnya menggunakan air, meremas daun binahong menggunakan tangan dengan menambahkan air yang sudah dimasak sebelumnya, atau dengan cara memblender daun kemudian menyaringnya. Pengolahan tersebut kurang efektif karena cara penyajiannya membutuhkan waktu yang cukup lama. Pengolahan dalam bentuk teh lebih praktis dalam penyajiannya dan dapat memberi nilai tambah dalam variasi pengolahan daun binahong tersebut. Teh herbal dapat diolah seperti pengolahan teh biasanya, dengan cara pengolahan teh hijau, teh oblong, ataupun teh hitam. Dalam penelitian ini dilakukan pengolahan teh herbal seperti pengolahan teh hijau karena teh hijau merupakan teh yang diolah tanpa melalui proses oksidasi enzimatis sehingga dapat mempertahankan kandungan bioaktif yang bersifat sebagai antioksidan didalam teh hijau tersebut (Dinda Putri dkk, 2021).

Pengolahan teh herbal dari daun binahong dengan cara pengolahan seperti teh hijau mempunyai kelemahan pada sifat sensorisnya seperti rasa yang agak kelat dan aroma yang kurang enak. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penambahan bahan tambahan dari cassiavera untuk penguat rasa dan aroma agar teh herbal daun binahong lebih enak untuk dikonsumsi. Sifat sensoris cassiavera yaitu agak pedas, sedikit manis, hangat, dan wangi.

Cassiavera merupakan nama dagang dari kulit batang tanaman kayu manis (*Cinnamomum burmanni*) yang telah dikeringkan. Kulit batang, maupun daun tanaman kayu manis mengandung minyak atsiri, flavonoid, polifenol, tanin, kalsium oksalat, eugenol, safrole, dan cynamaldehyde. Cassiavera mempunyai sifat kimia yang sama dengan tanaman kayu manis karena merupakan produk lanjutannya (Ananda, 2022).

2.1.4 Prosedur pembuatan Teh Daun Binahong

Proses pembuatan teh daun binahong dengan dosis yang telah ditentukan yaitu 2 gram, 4 gram dan 6 gram. Daun binahong dipilih yang baik dan dipisahkan dari yang rusak, daun binahong yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan dari kotoran daun yang menempel, selanjutnya dicuci dengan menggunakan air yang mengalir. Setelah itu, daun binahong dikeringkan sampai daun dapat dipatahkan atau berubah menjadi serpihan ketika diremas.

Daun binahong yang telah dikeringkan, diremas atau diayak kemudian ditimbang sebanyak 12 gram dan dibuat menjadi 3 bungkus, bungkus pertama 2 gram, bungkus kedua 4 gram dan bungkus ketiga 6 gram, masing-masing

wadah berisi aquadest 200 ml panas dan masukkan masing-masing bungkus teh daun binahong aduk sampai teh larut dan saring menggunakan penyaring (Lestari, 2022).

2.1.5 Toksisitas

Toksisitas dapat diartikan suatu keadaan yang menandai adanya efek toksik atau racun yang terdapat pada suatu bahan sebagai sediaan dosis tunggal atau campuran. Untuk mengetahui tingkat toksistas terhadap organisme hidup dapat dilakukan cara uji hayati atau uji toksisitas. Uji hayati adalah percobaan yang menggunakan organisme hidup untuk mengetahui adanya pengaruh dari suatu senyawa. Uji toksisitas dapat memberi informasi tentang pengaruh senyawa kimia terhadap organisme yang diuji, seperti hambatan pada pertumbuhan, tingkat kematian, perubahan perilaku, abnormalitas fungsi organ tubuh dan gangguan- gangguan fisiologis lainnya (Sanuki, 2020).

Berdasarkan postulat Paracelcus, bahwa sifat toksik suatu toksin sangat ditentukan oleh dosis (konsentrasi toksin pada reseptornya). Artinya kehadiran suatu zat yang berpotensi toksik di dalam suatu organisme belum tentu menghasilkan juga keracunan, misal insektisida rumah tangga (DDT) dalam dosis tertentu tidak akan menimbulkan efek yang berbahaya bagi manusia. Namun, pada dosis tersebut memberikan efek yang mematikan bagi serangga. Hal ini disebabkan karena konsentrasi tersebut berada jauh dibawah konsentrasi minimal efek pada manusia. Uji toksisitas terbagi menjadi:

A. Toksisitas Akut

Uji toksisitas akut adalah salah satu uji praklinik. Uji ini dirancang untuk mengukur derajat efek toksik suatu senyawa yang terjadi dalam waktu singkat, yaitu 24 jam setelah pemberiannya dalam dosis tunggal. Pengamatan dilakukan 24 jam pertama sejak diberikan perlakuan, dan 7–14 hari pada kasus tertentu. Uji toksisitas akut digunakan untuk menetapkan nilai LC_{50} dari suatu zat toksik. Penentuan nilai LC_{50} pada pengujian toksisitas akut merupakan tahap awal untuk mengetahui keamanan suatu zat yang akan digunakan manusia dosis secara tunggal. Nilai LC_{50} digunakan dalam penilaian rasio manfaat dan daya racun yang dinyatakan sebagai indeks terapi obat sehingga semakin besar indeks terapi maka semakin aman obat tersebut digunakan (Sanuki, 2020).

B. Toksisitas Subkronis

Uji toksisitas subkronis adalah uji untuk mengetahui toksisitas suatu senyawa yang dilakukan pada hewan coba dengan sedikitnya tiga tingkat dosis, umumnya dalam jangka waktu 90 hari. Toksisitas subkronik adalah efek yang ditimbulkan setelah penggunaan bahan- bahan yang bersifat toksik selama beberapa minggu atau bulan. Uji Toksisitas subkronik dilakukan dengan memberikan dosis berulang selama jangka waktu kurang lebih 10% dari masa hidup hewan. Uji subkronis juga digunakan untuk memberikan informasi mengenai target organ dan potensi terjadinya akumulasi senyawa kimia pada organisme (Sanuki, 2020).

C. Toksisitas Kronis

Uji Toksisitas Kronis zat uji diberikan selama sebagian besar masa hidup hewan uji, dengan durasi 2-7 tahun bergantung pada umur spesies. Spesies dipilih dari hasil uji subkronis sebelumnya, studi armakodinamik atas beberapa spesies hewan dan mungkin dapat juga pada manusia dengan dosis tunggal yang memungkinkan sebagai uji coba. Pengujian minimum dilakukan pada dua peringkat dosis dengan jalur pemberian jalur penggunaan dimaksud pada penggunaan dari bahan uji tersebut. Evaluasi yang dilakukan meliputi seluruh hewan ditimbang seminggu sekali, pemeriksaan badan lengkap seminggu sekali, uji kimia darah, analisis air kencing, pemeriksaan sebagai obat berdasarkan besarnya dosis yang dapat menyebabkan kematian 50% pada hewan uji dengan satuan berat badan setelah pemberian hematologi dan uji fungsi atas seluruh hewan pada interval 3 sampai 6 bulan dan atas seluruh hewan yang sakit atau abnormal. Uji toksisitas kronik meliputi juga uji karsinogenitas dan uji toksisitas reproduksi (Sanuki, 2020).

2.1.6 Jenis jenis Metode Toksisitas

Belakangan ini telah banyak pengujian tentang toksisitas yang dikembangkan untuk pencarian produk alam yang potensial sebagai bahan antineoplastik. Metode pengujian tersebut antara lain Simple Branch-Top Biassay (terdiri dari Brine Shrimp Lethality test, Lemna Minor Bioassay dan Crown-Gall Potato disc bioassay).

1) Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas menggunakan larva *Artemia salina* (*Brine Shrimp Lethality Test*) sering dianalogkan dengan kemampuan suatu bahan obat yang memiliki efek antikanker. Metode ini disarankan untuk digunakan pada skrining senyawa bioaktif bahan alam karena menunjukkan adanya korelasi dengan metode sitotoksik in vitro lainnya (Irma, 2017).

Metode ini sering digunakan untuk praskrining terhadap senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tanaman karena murah, mudah (tidak perlu kondisi aseptis) dan dapat dipercaya. Sifat sitotoksik dapat diketahui berdasarkan jumlah kematian larva pada konsentrasi tertentu. Uji pendahuluan toksisitas digunakan untuk mengetahui toksin jamur, toksisitas ekstrak tanaman, logam berat, toksin cyanobacteria, pestisida, dan uji sitotoksitas bahan pembuatan gigi (Irma, 2017).

2) *Lemna Minor Bioassay*

Metode ini terutama digunakan sebagai uji pendahuluan terhadap bahan yang dapat menghambat dan meningkatkan pertumbuhan tanaman. Dengan pengujian ini dapat diamati bahwa senyawa antitumor alami juga dapat menghambat pertumbuhan *Lemna*, walaupun korelasinya dengan pengujian antitumor lainnya kurang baik. Oleh karena itu pengujian ini lebih diarahkan untuk mencari herbisida dan stimulant pertumbuhan tanaman baru (Irma, 2017).

3) *Crown-Gall Potato Bioassay*

Metode ini merupakan metode pengujian toksisitas yang relative cepat pengerjaannya, tidak mahal, tidak memerlukan hewan percobaan serta menunjukkan korelasi yang sangat baik dengan uji antitumor lainnya. *Crown-Gall* merupakan suatu penyakit neoplastic pada tumbuhan yang disebabkan bakteri gram negatif *Agrobacterium tumefaciens* yang selanjutnya menyebabkan pertumbuhan jaringan tumor secara otonom dan tidak dipengaruhi oleh mekanisme kontrol normal tumbuhan. Pengujian dilakukan dengan mengukur kemampuan suatu senyawa menghambat pertumbuhan tumor *Crown-Gall* pada umbi kentang yang di infeksi dengan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (Irma, 2017).

2.1.7 Metode Uji Toksisitas (*Simple Bench Top Biassays*)

Uji toksisitas diperuntukkan dalam dua hal yaitu untuk evaluasi keamanan senyawa dan untuk mendeteksi aktivitas antikanker suatu senyawa. Metode untuk melakukan uji ini yang disebut *Simple Bench Top Bioassays*, yaitu *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) :

Berdasarkan pemikiran bahwa efek farmakologi adalah toksikologi sederhana pada dosis yang rendah dan sebagian besar senyawa antikanker adalah sitotoksik, maka *Brine Shrimp Lethality Test* dapat digunakan sebagai uji pendahuluan senyawa antikanker. Senyawa yang mempunyai kemampuan membunuh larva udang *Artemia salina* diperkirakan juga mempunyai kemampuan membunuh sel kanker dalam kultur sel. Hasil uji toksisitas

dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa anti kanker. Berdasarkan penelitian Meyer terhadap jenis euphorbiaceae, dari 24 jenis yang aktif (*sel leukimia secara in vitro*), 14 di antaranya toksik terhadap larva udang laut (*Artemia salina*). Pengujian ini adalah uji letalitas yang sederhana dan tidak spesifik untuk aktivitas antikanker, tetapi merupakan indikator toksisitas yang baik dan menunjukkan korelasi kuat dengan pengujian antikanker lainnya seperti uji sitotoksitas dan uji leukimia tikus (Sanuki, 2020).

Metode ini juga digunakan untuk mendeteksi keberadaan senyawa toksik dalam proses isolasi senyawa dari bahan alam yang berefek sitotoksik dengan menentukan harga LC_{50} dari senyawa aktif. Apabila nilai $LC_{50} < 1000$ mcg/ml, maka senyawa tersebut bersifat toksik dan memiliki potensi sitotoksik (Sanuki, 2020).

Tabel 1. Kategori toksisitas berdasarkan nilai LC_{50} : (Wagner dkk (1993)

Kategori	Nilai LC_{50} (ug/ml)
Sangat toksik	< 30
Toksik	$30 - 1000$
Tidak toksik	>1000

Metode ini banyak digunakan dalam tahap praskrining misalnya pada: Enam jenis kultur sel line tumor pada manusia di laboratorium Purdue Cancer Center. Beberapa obat antikanker telah diuji dengan menggunakan metode BSLT, di antaranya Podofilotoksin dan Adriamisin. Podofilotoksin

memberikan nilai LC_{50} , 4mcg/ml, sedangkan nilai LC_{50} Adriamisin sebesar 0,08 mcg/ml. Oleh karena itu pengujian ini merupakan tahap awal untuk mengetahui apakah senyawa tersebut berpotensi atau tidak sebagai antikanker yang selanjutnya dapat dilakukan uji sitotoksik menggunakan biakan sel kanker (Sanuki, 2020).

Beberapa kelebihan dari uji toksisitas dengan BSLT antara lain:

- A. Merupakan metode penapisan farmakologi awal yang mudah, cepat, dan relative tidak mahal.
- B. Metode yang telah teruji hasilnya dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengamati toksisitas suatu senyawa dalam ekstrak kasar tumbuhan.
- C. Metode ini sering digunakan dalam tahap awal isolasi senyawa toksik yang terkandung dalam suatu ekstrak. Metode ini sering dihubungkan sebagai metode penapisan untuk mencari senyawa antikanker dari tumbuhan (Sanuki, 2020).

2.1.8 Hewan Percobaan

Artemia Salina Leach

Artemia merupakan zooplankton dari anggota crustacea yang digunakan sebagai pakan alami lebih dari 85% jenis hewan budidaya. Hidup di danau-danau garam yang ada diseluruh dunia. *Artemia* toleran terhadap selang salinitas yang sangat luas, mulai dari nyaris tawar hingga jenuh garam. Secara alamiah, salinitas danau di mana artemia hidup sangat bervariasi, tergantung pada jumlah hujan dan penguapan yang terjadi.

Apabila kadar garam kurang dari 6%, telur artemia akan tenggelam sehingga tidak bisa menetas. Apabila kadar garam lebih dari 25%, telur akan tetap berada dalam kondisi tersuspensi sehingga dapat menetas dengan normal.

Klasifikasi ilmiah (Sanuki, 2020).

Kerajaan : Animalia
 Divisi : Arthropoda
 Subdivisi : Crustacea
 Kelas : Branchiopoda
 Bangsa : Anostraca
 Suku : Artemiidae
 Marga : Artemia L.
 Jenis : Artemia salina Leach

Artemia merupakan kelompok udang-udangan dari *phylum Arthropoda*. *Artemia* hidup di danau-danau garam (berair asin) yang ada di seluruh dunia. Udang ini toleran terhadap selang salinitas yang sangat luas, mulai dari nyaris tawar hingga jenuh garam. Secara alamiah salinitas danau dimana mereka hidup sangat bervariasi tergantung pada jumlah hujan dan penguapan yang terjadi. Apabila kadar garam kurang dari 6 % telur *Artemia salina* akan tenggelam sehingga telur tidak bisa menetas, hal ini biasanya terjadi apabila air tawar banyak masuk ke dalam danau dimusim penghujan. Sedangkan apabila kadar garam lebih dari 25 % telur akan tetap berada dalam kondisi tersuspensi, sehingga dapat menetas dengan normal (Fatimatuzzahra, 2013).

Telur *Artemia salina* atau *cyste* berbentuk bulat berlekuk dalam keadaan kering dan bulat penuh dalam keadaan basah. Warnanya coklat yang diselubungi oleh cangkang yang tebal dan kuat. Cangkang ini berguna untuk melindungi embrio terhadap pengaruh kekeringan, benturan keras, sinar ultraviolet dan mempermudah pengapungan. Telur dapat mengadsorpsi air, jika tersinari oleh sinar matahari atau pada suhu sekitar 26–28 °C maka akan menetas setelah 24–48 jam tergantung pada kondisi lingkungan. *Artemia salina* yang baru menetas disebut dengan naupli (larva) yang memiliki ukuran 0,25 mm (0,01 inci) (Fatimatuzzahra, 2013).

Artemia salina mengalami puberitas selama 8–14 hari dan akan hidup selama 4–5 minggu tergantung pada konsentrasi garam, terlalu banyak garam maka harapan hidup akan berkurang. Hewan ini dapat tumbuh dan berkembang pada air garam. Larutan air garam dapat dibuat dengan melarutkan 30 g garam ke dalam 1 L air. Banyak orang menggunakan garam biasa untuk membuat medianya tanpa adanya penambahan iodium dan zat kimia lainnya karena dapat memperburuk pertumbuhannya. Air laut merupakan media pertumbuhan yang lebih baik.

Pembiakan *Artemia* dapat dilakukan melalui perkawinan antara *Artemia* jantan dan betina, tetapi *Artemia salina* juga memiliki sifat partenogenesis sehingga *Artemia* betina dapat berkembangbiak tanpa perkawinan.

Artemia betina dapat mempunyai keturunan sekitar 300 setiap 4 hari. Makanan *Artemia* berupa bubuk alga ataupun ragi (Wardhana, 2020). Dalam

pemeliharaan *Artemia salina* makanan yang diberikan adalah: katul, padi, tepung beras, tepung terigu, tepung kedelai dan ragi *Artemia* hanya dapat menelan makanan yang berukuran kecil yaitu kurang dari 50 mikron. Apabila makanan lebih besar dari ukuran itu, makanan tidak akan tertelan karena *Artemia* mengambil makanan dengan jalan menelannya bulat-bulat. Makanan yang akan ditelan itu dikumpulkan dulu ke depan mulut dengan menggerakkan kakinya. Gerakan kaki dilakukan terus-menerus hingga makanan akan terus bergerak masuk ke dalam mulutnya. Selain untuk mengambil makanan, kakinya berfungsi sebagai alat untuk bergerak dan bernafas (Surya Alfin, 2018).

Siklus hidup *Artemia* bisa dimulai dari saat menetasnya kista atau telur. Setelah 15–20 jam pada suhu 25 °C kista akan menetas menjadi embrio. Dalam waktu beberapa jam embrio ini masih akan tetap menempel pada kulit kista. Pada fase ini embrio akan menyelesaikan perkembangannya kemudian berubah menjadi naupli yang sudah bisa berenang bebas. Pada awalnya naupli akan berwarna orange kecoklatan akibat masih mengandung kuning telur (Fatimah Rosa, 2019).

Artemia salina sering digunakan sebagai hewan uji toksisitas. Telur *Artemia salina* dapat bertahan dalam kondisi kering dan dapat disimpan cukup lama. Telur ini bila diberi air laut pada suhu 23 °C maka ia akan menetas dalam 1–2 hari dan dapat langsung digunakan dalam uji toksisitas. Uji toksisitas pada hewan uji dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil terhadap manusia untuk mencari dosis yang aman. Parameter yang digunakan dalam

uji ini adalah efek toksikan (respon) terhadap hewan uji yang dapat dilihat hanya berupa immobilisasi ke dalam tiap tabung berisi konsentrasi toksikan yang berbeda dimasukkan 10 ekor hewan uji, disertai dengan tabung kontrol. Immobilisasi ini sudah dianggap sebagai kematian untuk hewan uji seperti *Artemia salina*. LC_{50} diperoleh dengan ekstrapolasi kurva (Jasmarullah, 2018).

2.1.9 Cairan Pelarut

Terdapat tiga golongan pelarut yaitu :

1. Pelarut Polar

Pelarut polar adalah senyawa yang memiliki rumus umum $R-OH$ dan menunjukkan adanya atom hidrogen yang menyerang atom elektronegatif (Oksigen). Pelarut dengan tingkat kepolaran tinggi merupakan pelarut yang cocok untuk semua jenis zat aktif karena di samping menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar, pelarut ini juga tetap dapat menarik senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran lebih rendah. Contoh pelarut diantaranya : air, methanol, etanol, dan asam asetat (Fazihkun, 2020).

2. Pelarut Semipolar

Pelarut semi polar adalah pelarut yang memiliki molekul yang tidak mengandung ikatan $O-H$. Pelarut semi polar memiliki tingkat kepolaran yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut polar. Pelarut ini baik digunakan untuk melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat semipolar dari tumbuhan. Contoh : Aseton, etil asetat, diklorometon (Febrianti, 2022).

3. Pelarut Non Polar

Pelarut non polar merupakan senyawa yang memiliki konstan dielektrik yang rendah dan tidak larut dalam air. Pelarut ini baik digunakan untuk menarik senyawa-senyawa yang sama sekalitidak larut dalam pelarut polar seperti minyak. Contoh : Heksana, Kloroform, dan Eter (Maulida, 2020).

2.1.10 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu metode pilihan kromatografi secara fisikokimia (Gandjar & Rohman, 2007). KLT merupakan bentuk kromatografi planar, selain kromatografi kertas dan elektroforesis. Pada KLT Fase diamnya berupa lapisan yang seragam (uniform) pada permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, pelat alumunium atau plat plastik. Meskipun demikian, kromatografi planar ini merupakan bentuk terbuka dari kromatografi kolom (Prawirodihardjo, 2014).

KLT dapat dipakai dengan dua tujuan. Pertama, dipakai untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif atau preparatif. Kedua dipakai untuk menjajaki sistem pelarut dan sistem penyangga yang akan dipakai dalam kromatografi kolom (Prawirodihardjo, 2014).

Kromatografi lapis tipis (KLT) dapat digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisa senyawa-senyawa organik dalam jumlah kecil misalnya, menentukan jumlah komponen dalam campuran dan menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan KLT preparatif. Sedangkan KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya, yang selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dikumpulkan dan digunakan untuk

analisa berikutnya (Prawirodihardjo, 2014).

KLT merupakan teknik yang benar-benar menguntungkan karena tingkat sensitifitasnya sangat besar dan konsekuensinya jumlah sampel lebih sedikit. Fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang atau cairan pengelusi akan bergerak sepanjang fase diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara mekanik (*ascending*), atau karena pengaruh gravitasi pada pengembangan menurun (*descending*) (Prawirodihardjo, 2014)

Jumlah volume fase gerak harus mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang telah ditentukan. Setelah lempeng terelusi, dilakukan deteksi bereak. Laju pergerakan fase gerak terhadap fase diam dihitung sebagai retention factor (RF). Nilai RF diperoleh dengan membandingkan jarak yang ditempuh oleh zat terlarut dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak (Prawirodihardjo, 2014).

Fase gerak harus memiliki kemurnian yang tinggi. Hal ini dikarenakan KLT merupakan teknik yang sensitif. Fase gerak yang digunakan adalah pelarut organik yang memiliki tingkat polaritas tersendiri, melarutkan senyawa contoh, dan tidak bereaksi dengan penjerap. Adsorben umumnya digunakan dalam KLT meliputi partikel silika gel ukuran 12 um, alumina, mineral oksida, silika gel dengan ikatan kimia, selulosa, poliamida, polimer penukar ion, silika gel, dan fase kiral (Prawirodihardjo, 2014).

Ada beberapa cara untuk mendeteksi senyawa yang tidak berwarna pada kromatogram. Deteksi paling sederhana adalah jika senyawa menunjukkan penyerapan di daerah UV gelombang pendek (radiasi utama

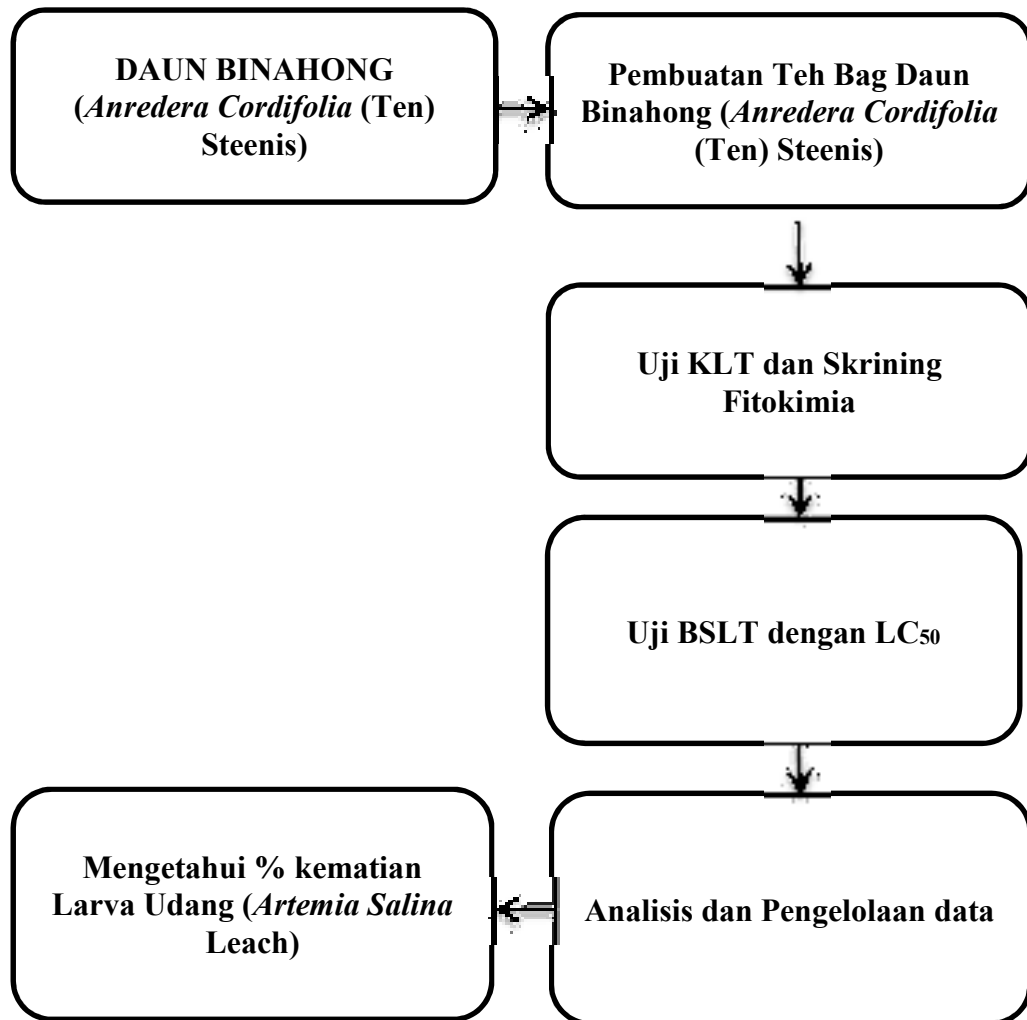
kira-kira 254 nm) atau jika senyawa itu dapat dieksitasi pada radiasi UV gelombang pendek dan gelombang panjang (365 nm). Pada senyawa yang mempunyai dua ikatan rangkap atau lebih dan senyawa aromatik seperti turunan benzena, mempunyai serapan kuat di daerah 230-300 nm (Prawirodihardjo, 2014).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan nilai RF. Polaritas fase gerak perlu diperhatikan pada analisa dengan KLT, sebaiknya digunakan campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin. Campuran yang baik memberikan fase gerak yang mempunyai kekuatan bergerak sedang. Secara umum dikatakan bahwa fase diam yang polar akan mengikat senyawa polar dengan kuat sehingga bahan yang kurang sifat kepolarannya akan bergerak lebih cepat dibandingkan bahan-bahan polar (Prawirodihardjo, 2014).

Fase gerak harus memiliki kemumian yang tinggi. Hal ini dikarenakan KLT merupakan teknik yang sensitif. Fase gerak yang digunakan adalah pelarut organik yang memiliki tingkat polaritas tersendiri, melarutkan senyawa contoh, dan tidak bereaksi dengan penjerap (Prawirodihardjo, 2014).

Pelarut yang ideal harus melarutkan linarut dan harus cukup baik sebagai pelarut yang bersaing dengan daya serap penjerap. Keadaan yang ideal tersebut mungkin terjadi jika pelarut tidal berproton seperti hidrokarbon, eter dan senyawa karbonil dipakai sebagai pelarut pengembang (Prawirodihardjo, 2014).

2.2 Kerangka Konsep



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Maret 2023 di Laboratorium Sekolah Tinggi Kesehatan Al-Fatah Bengkulu.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, blender, kaca arloji, cawan penguap, timbangan analitik, gelas ukur 100 mL, erlenmeyer 300 mL, pengaduk kaca, penyaring Buchner, rotary evaporator, beaker glass 100 mL, desikator, pipet tetes, pipet ukur, tabung reaksi, penjepit, corong kaca, labu ukur, pipet mikro, bejana untuk penetasan telur udang, lampu dan botol vial.

3.2.2. Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis), etanol, etil asetat dan n-heksana, asam sulfat, logam Mg, Formaldehid, asam klorida, asam asetat anhidrida, reagen mayer, asam asetat glasial, reagen Dragendrof, reagen Lieberman-Burchard, larutan gelatin, kertas saring, aluminium foil, larva udang (*Artemia salina* Leach), dimetil sulfoksida (DMSO), ragi roto dan airlaut.

3.3. Prosedur Kerja Penelitian

3.3.1. Verifikasi tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Verifikasi ini dilakukan agar tidak terjadi kesalahan dalam pengambilan bahan utama yang akan digunakan. Verifikasi ini akan dilakukan di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Laboratorium Biologi Universitas Bengkulu.

3.3.2. Pengambilan sampel

Pada pengambilan sampel daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yaitu diambil dari perumahan Griya Asri Betungan Kota Bengkulu.

3.3.3. Pengelolaan sampel

Proses pertama yang dilakukan adalah penanganan awal pada daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yaitu dengan cara membersihkan daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dari kotorannya, dengan cara dicuci menggunakan air yang mengalir kemudian dirajang kecil-kecil. Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang sudah dirajang dikeringkan menggunakan oven dengan variasi suhu yang telah ditetapkan yaitu 35°C, 50°C, dan 65°C selanjutnya simplisia dihaluskan dengan cara diremas–remas.

3.3.4. Evaluasi simplisia

1. Uji Makroskopik

Bertujuan untuk menentukan ciri khas simplisia dengan pengamatan secara langsung berdasarkan bentuk simplisia dan ciri-ciri organoleptik

seperti bau, rasa, warna, dan Bentuk simplisia Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) (Khorani, 2013).

2. Susut Bobot Simplisia

Susut Bobot diukur dengan menimbang berat awal dan berat kering setelah proses pengeringan dengan suhu berbeda menggunakan neraca digital. Pengamatan susut bobot dilakukan setelah proses pengeringan selesai. Perhitungan susut bobot dilakukan dengan membandingkan bobot akhir dan bobot.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

1. Analisis Kadar Air

Analisis kadar air dilakukan dengan metode thermografi yaitu dengan pemanasan. Analisis ini yang dilakukan yaitu menggunakan daun binahong sebanyak 3 kali pengulangan. Cawan yang digunakan dipanaskan dahulu dalam oven pada suhu 100–105°C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian disimpan cawan dalam desikator sekitar 10 menit.

Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Sampel dipotong kecil-kecil, ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya, selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 100–105°C selama sekitar 1 jam. Sampel kering didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sampel dipanaskan kembali dalam oven $\pm$ 20 menit pada suhu yang sama, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan

ini diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus pada lampiran 1.

2. Preparasi Sampel

Sebanyak 1 Kg daun binahong dicuci bersih, diiris kecil-kecil dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 37–40 °C selama 1–2 jam kemudian dijemur sampai diperoleh berat konstan (kering). Daun binahong yang kering kemudian dihaluskan menjadi serbuk dan diayak dengan ukuran 60 mesh, hasil yang diperoleh digunakan sebagai sampel penelitian.

3. Uji Toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina* Leach

A. Penetasan Telur

Telur udang ditetaskan 2 hari sebelum dilakukan uji. Disiapkan bejana untuk penetasan telur udang. Wadah yang digunakan dibagi menjadi dua bagian, bagian gelap dan terang kemudian ditambahkan air laut buatan. Satu ruang dalam bejana tersebut diberi penerangan dengan cahaya lampu pijar/neon 40-60 watt untuk menghangatkan, sedangkan di ruang sebelahnya diberi air laut buatan tanpa penyinaran ditutup dengan aluminium foil. Telur yang telah dicuci ditempatkan/direndam pada bagian gelap dari wadah berisi air laut buatan sekitar 300 mL. Telur udang yang terendam air laut buatan dibiarkan selama 2 x 24 jam sampai menetas menjadi benur (*nauplius*) (Kurniawan & Ropiqa, 2021).

4. Toksisitas

Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada masing-masing ekstrak sampel.

- a) Botol disiapkan untuk pengujian, masing-masing ekstrak membutuhkan 8 botol dan 3 botol sebagai kontrol.
- b) Ekstrak kental n-heksana, etil asetat, dan etanol ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya masing-masing sebanyak 10 mL untuk membuat larutan stok 10.000 ppm.
- c) Dari larutan stok tersebut kemudian dipipet sesuai dengan konsentrasinya, sehingga konsentrasinya masing-masing larutan menjadi 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 dan 100 ppm. dimasukkan ke dalam botol dan pelarutnya dibiarkan selama 24 jam.
- d) Selanjutnya dimasukkan 100 μ L dimetil sulfoksida (DMSO), 2 mL air laut dan 10 ekor larva udang. Kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL
- e) Kontrol dibuat dengan dimasukkan 2 mL air laut, 100 μ L dimetil sulfoksida, 10 ekor larva udang dan setetes larutan ragi roti ke dalam botol
- f) kemudian ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.
- g) Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva udang.
- h) Selanjutnya dihitung mortalitas dengan cara: akumulasi mati dibagi jumlah akumulasi hidup dan mati (total) dikali 100 %.
- i) Grafik dibuat dengan log konsentrasi sebagai sumbu x terhadap mortalitas sebagai sumbu y. Nilai LC50 merupakan konsentrasi dimana zat menyebabkan kematian 50 % yang diperoleh dengan memakai persamaan regresi linier $y = a + bx$. Suatu zat dikatakan aktif atau toksik bila nilai LC50

< 1000 ppm untuk ekstrak dan < 30 ppm untuk suatu senyawa (Sharo dkk, 2013).

5. Uji Fitokimia dengan Uji Reagen

Uji fitokimia kandungan senyawa aktif dengan uji reagen dari ekstrak pekat etil asetat, diklorometana dan petroleum eter dari tanaman anting-anting dilarutkan dengan sedikit masing-masing pelarutnya. Kemudian dilakukan terhadap uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid dan steroid (Jazilah, 2014).

6. Uji Alkaloid

Seduhan air Teh Bag daun binahong dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2 % dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2–3 tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2–3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan, menunjukkan adanya alkaloid (Sharo dkk, 2013).

7. Uji Flavonoid

Seduhan air Teh Bag daun binahong dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1–2 mL metanol panas 50 %. Setelah itu ditambah logam Mg dan 4–5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk, menunjukkan adanya flavonoid (Sharo dkk, 2013).

8. Uji Tanin

a. Uji dengan FeCl_3

Seduhan air Teh Bag daun binahong ditambahkan dengan 2–3 tetes larutan FeCl_3 1 %. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tinta, maka bahan tersebut mengandung tanin (Jazilah, 2014).

b. Uji dengan Larutan Gelatin

Seduhan air Teh Bag daun binahong dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih, menunjukkan adanya tanin (Jazilah, 2014).

9. Uji Saponin

Seduhan air Teh Bag daun binahong dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah 10 mL air sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan 2 tetes HCl 1 N, bila busa yang terbentuk bisa tetap stabil maka ekstrak positif mengandung saponin (Jazilah, 2014).

10. Uji Triterpenoid dan Steroid

Seduhan air Teh Bag daun binahong dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu dipanaskan dan didinginkan. Diambil 1 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditetaskan pereaksi Lieberman-burchard. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Jazilah, 2014).

3.5. Prosedur Kerja Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode KLT merupakan pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorbs dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya (Dinnar, 2020).

Prosedur Kromatografi Lapis Tipis (KLT) melibatkan beberapa langkah untuk mencapai pemisahan dan visualisasi komponen yang efektif. Prosedur umum adalah sebagai berikut:

1. **Persiapan Plat TLC:** Fase diam diterapkan secara seragam ke permukaan pelat. Saat ini, pelat TLC siap pakai dengan fase diam pra-pelapisan umum digunakan, menghilangkan kebutuhan untuk aplikasi manual dan pengeringan.
2. **Menandai Plat:** Dengan menggunakan pensil, garis tipis digambar di bagian bawah pelat KLT. Baris ini berfungsi sebagai referensi untuk menerapkan titik sampel.
3. **Penerapan Sampel:** Solusi sampel diterapkan dengan hati-hati ke titik-titik yang ditandai pada garis pada jarak yang sama. Ini biasanya dilakukan dengan menggunakan pipet mikro-kapiler atau mikropipet untuk memastikan aplikasi sampel yang tepat.

4. **Persiapan TLC Chamber :** Fase gerak, yang terdiri dari pelarut atau campuran pelarut yang sesuai, dituangkan ke dalam ruang KLT. Tingkat fase gerak harus beberapa sentimeter di atas dasar bejana.
5. **Menambahkan Kertas Filter yang Dibasahi:** Kertas saring jenuh dengan fase gerak ditempatkan di dinding bagian dalam ruang TLC. Ini membantu menjaga kelembaban yang sama di dalam ruangan dan mencegah efek tepi selama proses pengembangan.
6. **Penempatan Plat KLT:** Pelat KLT yang disiapkan dengan titik sampel ditempatkan di dalam bejana dengan sisi yang berisi garis sampel menghadap ke fase gerak. Ruang tersebut kemudian ditutup dengan penutup untuk memastikan lingkungan yang terkendali.
7. **Pengembangan Pelat:** Pelat TLC dibiarkan berkembang di dalam bilik. Pelat dibenamkan sedemikian rupa sehingga bercak sampel jauh di atas permukaan fase gerak tetapi tidak langsung dicelupkan ke dalam pelarut. Waktu yang cukup diberikan untuk senyawa untuk memisahkan dan bermigrasi di piring.
8. **Penghapusan dan Pengeringan:** Setelah pemisahan yang diinginkan tercapai, pelat TLC dengan hati-hati dikeluarkan dari bilik. Kemudian dibiarkan kering sepenuhnya sebelum analisis lebih lanjut.
9. **Visualisasi Bintik:** Pelat TLC yang dikembangkan divisualisasikan untuk mengamati titik-titik yang terpisah. Berbagai teknik dapat digunakan untuk visualisasi, tergantung pada sifat sampel.

Metode KLT merupakan pemisahan komponen kimia berdasarkan prinsip adsorpsi dan partisi yang ditentukan oleh fase diam (adsorben) dan fase gerak (eluen). Komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan jarak yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya.

Pada pemisahan ini plat yang digunakan sebagai fase diam adalah silika gel GF254 karena analit tidak berwarna sehingga digunakan silika gel GF254. Silika gel ini mampu berfluoresensi dengan baik pada sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm

Fase gerak yang digunakan dalam skrining fitokimia ini adalah plat silika gel GF254 dengan ukuran 1×5 cm yang telah diaktivasi dengan dipanaskan pada suhu 105°C selama 10 menit. Hal tersebut bertujuan untuk mengurangi kadar air agar plat silika dapat menyerap senyawa yang akan dipisahkan. Bejana yang digunakan dan berisi eluen dijenuhkan terlebih dahulu agar seluruh permukaan bejana terisi uap dari eluen sehingga mendapatkan hasil yang baik. Penjenuhan bejana bertujuan supaya mendapatkan homogenitas di dalam bejana dan meminimalkan penguapan pelarut di lempeng KLT (Dinnar, 2020).

Perhitungan Nilai RF (*Retention factor*)

Nilai RF menggambarkan jarak yang ditempuh oleh komponen tertentu dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh solven. Faktor yang dapat memengaruhi nilai RF yaitu jumlah penotolan, suhu, dan uap dalam bejana

pengembangan yang digunakan. Faktor ini dapat menyebabkan perbedaan nilai RF pada pengulangan yang dilakukan dan hasil yang didapatkan bisa saja berbeda jauh (Fajriani dkk, 2022). Rumus yang digunakan untuk menghitung nilai RF, yaitu :

$$Rf = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik pusat awal}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh solven}}$$

3.6. Analisis Data

Data uji toksisitas dianalisis untuk menguji adanya pengaruh atau perbedaan antara perlakuan konsentrasi ekstrak daun binahong terhadap pertumbuhan *Artemia Salina* Leach. Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dideskripsikan hasilnya. Tingkat toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach dapat diketahui dengan melakukan uji LC₅₀ menggunakan program SPSS.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, M. H., Pidada, I. B., & Utami, C. S. (2013). Imunotoksitas pewarna makanan terhadap histopatologi Peyer's patch goblet mencit (The immunotoxicity of food additive on histopatology of mice Peyer's patch goblet). *Jurnal Bios Logos*, 3(1), 18–23.
- Ananda, F. J. (2022). *Pengaruh Penambahan Ekstrak Cassia Vera Terhadap Karakteristik Mutu Hard Candy*. 52.
- Ayu, P., Surbakti, A., Queljoe, E. De, & Boddhi, W. (2018). Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Andredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Denga Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *PHARMACONJurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT*, 7(3), 22–31.
- Dinda Putri, K., Ari Yusasrini, N. L., & Nocianitri, K. A. (2021). Pengaruh Metode Pengolahan Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Karakteristik Teh Herbal Bubuk Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Delile). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan (ITEPA)*, 10(1), 77.
- Dinnar, N. latiefah. (2020). Uji Aktivitas Penghambatan Enzim Alfa Amilase Ekstrak dan Fraksi Daun Binahong Merah (*anredera cordifolia* (ten.) Steenis). *Jurnal Indonesia Sosial Sains*, 3(Oktober), 1361–1376.
- Eriadi dkk., 2015. (2015). The Effect of Ethanol Extract of Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Leaves on Science Wound Healing in White Male Rats. *Jurnal Farmasi Higea*, 7(2), 162–173.
- Fajriani, N., Kurniawan, H., & Nugraha, F. (2022). Identifikasi Pewarna Rhodamin

- B Pada Lipstik dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research (JSSCR)*, 4(3), 671–678.
- Fatimah Rosa, S. B. S. A. (2019). Uji Toksisitas Rebusan Daun Kersen (*Muntingia Calabura L.*) Menggunakan Metode Bslt (Brine Shrimp Lethality Test). 1–8.
- Fatimatuzzahra, F. (2013). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum canum Sims*) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Skripsi FKIK, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta*, 1–64.
- Fazihkun, C. (2020). Senyawa Saponin Dari Ekstrak Etanol Akar Biduri (*Calotropis Gigantea L*) Dengan Metode Gravimetri.
- Febrianti, R. (2022). Fraksinasi Dan Skrining Fraksi Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis) Dengan Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Pharmacy*, 9(2), 83–90.
- Hany Anastasia, M., Rahayu Santi, S., & Manurung, M. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Pada Kulit Batang Tumbuhan Gayam (*Inocarpus Fagiferus Fosb.*). *Jurnal Kimia*, 15–22.
- Hendra Gunawan, D., Negeri Pontianak, P., Teknologi Pertanian dan Administrasi Bisnis, J., Jenderal Ahmad Yani Pontianak, J., & Barat, K. (2018). Penurunan Senyawa Saponin Pada Gel Lidah Buaya Dengan Perebusan Dan Pengukusan Decreasing Saponin Compounds on Aloe Vera Gelwith Boiling and Steaming. *Jurnal Teknologi Pangan*, 9(1), 2597–436.
- Irma. (2017). Uji Toksisitas Fraksi Daun Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) Dengan Menggunakan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). In *Ekp* (Vol. 13,

Issue 3).

Irwanta, E., Hikmat, A., Ervizar, D., & Zuhud, A. M. (2015). Keanekaragaman Simplisia Nabati dan Produk Obat Tradisional yang Diperdagangkan di Kabupaten Pati, Jawa Tengah K. *Media Konservasi*, 20(3), 197–204.

Jasmarullah, M. F. (2018). *Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah efek toksikan (respon) terhadap hewan uji yang dapat dilihat hanya berupa immobilisasi ke dalam tiap tabung berisi konsentrasi toksikan yang berbeda dimasukkan 10 ekor hewan uji, disertai dengan tabung kontrol. 120(1), 0–22.*

Jazilah, N. (2014). Uji Toksisitas Ekstrak Daun Binahong (Anredera Cordifolia (Ten) Steenis) Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). In *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* (Vol. 17, Issue 3).

Jelita, S. F., Setyowati, G. W., Ferdinand, M., Zuhrotun, A., & Megantara, S. (2020). Uji Toksisitas Infusa Acalypha simensis dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Farmaka*, 18(1), 14–22.

Karim, M. (2017). Analisis Fenolik Dan Daya Hambat Daun Binahong (Anredera Cordifolia (Ten.) Steenis) Terhadap Bakteri Eschericia coli DAN Staphylococcus aureus. *Indonesian Chemistry and Application Journal*, 1(1), 1.

Kumalasari, A., Handayani, W., & Siswoyo, T. A. (2019). Screening Fitokimia dan Studi Aktivitas Ekstrak Daun Sintok (Cinnamomum sintoc Bl.) Sebagai Antioksidan dan Antihiperlipidemia. *Berkala Sainstek*, 7(1), 24.

Kurniawan, H., & Ropiqa, M. (2021). Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Ekor

- Kucing (*Acalypha hispida* Burm.f.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 3(2), 52–62.
- Lestari, G. (2022). Uji Asam Urat Terhadap Teh Duan Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis) Pada Mencit Jantan Putih (*Mus Musculus*). *Jurnal Ilmiah Pharmacy*, 9(2), 54–63.
- Lestari, G., Noviyanty, Y., Widian, G., Chaniago, F., & Dea, K. P. (2023). *Penyuluhan Tentang Pembuatan Teh Daun Binahong (Anredera cordifolia (Ten) Steenis), Sebagai Pengobatan Asam Urat Di SMAN 07 Kota Bengkulu Conseling On Making Binahong Tea (Anredera Cordifolia (Ten) Steenis), Ad A Treatment For Gout At SMAN 07 Beng. 2*, 67–70.
- Maulida, Z. (2020). Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Etanol Daun Sambung Nyawa *Gynura procumbens* (Blume) Miq. *Skripsi*, 1(1), 1–62.
- Mustapa, M. A. (2018). Uji Toksisitas Akut Yang Diukur Dengan Penentuan Ld50 Ekstrak Etanol Bunga Cengkeh (*Syzygium Aromaticum* L.) Terhadap Mencit (*Mus Musculus*) Menggunakan Metode Thompson-Weil. *Frontiers: Jurnal Sains Dan Teknologi*, 1.
- Nurasmi, K. (2020). Uji Aktivitas Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten) Steenis) Terhadap Cacing *Ascaridia Galli* Secara In Vitro. *Sustainability (Switzerland)*, 14(2), 1–4.
- Prawirodihardjo, E. (2014). Uji aktivitas antioksidan dan uji toksisitas ekstrak etanol 70% dan ekstrak air laut batang kayu jawa (*lannea coromandelica*). *Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Uin Syarif Hidayatullah Jakarta*,

- Rina Wahyuni, Guswandi, H. R. (2014). Pengaruh Cara Pengeringan Dengan Oven, Kering Angin dan Cahaya Matahari Langsung Terhadap Mutu Simplisia Herba Sambiloto. *Fakultas Farmasi Universitas Andalas (UNAND) Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang*, 6(2), 126–133.
- Sanuki, Y. C. (2020). *Uji Pendahuluan Anti Kanker Dari Ekstrak Etanol Biji Kebiul (Caesalpinia Bonduc (L) Roxb) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (Bslt)*.
- Sari, K. W. (2019). Karya Tulis Ilmiah Uji Efektivitas Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Herba Seledri (*Apium Graveolens L.*) Dan Daun Binahong (*Anredera Cordifolia (Ten) Steenis*) Pada Tikus Putih. *Rabit : Jurnal Teknologi Dan Sistem Informasi Univrab*, 1(1), 2019.
- Sharo, N. M., Ningsih, R., Hanapi, A., & Nasichuddin, A. (2013). Uji Toksisitas Dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma Cottonii*) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. *Alchemy*, 2(3).
- Simaremare, E. . (2014). Skrining Fitokimia Daun Gatal (*Laportea decumana (roxb.) Wedd*). *Pharmacy*, 11(01), undefined.
- Surya Alfin. (2018). Toksisitas Eksrtak Metanol Kulit Jengkol (*Pithecellobium Jiringa*) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test Terhadap Larva Udang (*Artemia Salina*). *Jurnal Rekayasa Sistem Industri*, 3(2), 149–153.
- Taek, Y. M. (2018). Uji aktivitas antioksidan infusa daun binahong (*anredera cordifolia (ten.) steenis*) dengan metode dpvh (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). *Karya Tulis Ilmiah Program Studi Farmasi Kupang*, 25.

- Utami, M., Widiawati, Y., & Hidayah, H. A. (2013). Keragaman dan Pemanfaatan Simplisia Nabati yang Diperdagangkan di Purwokerto. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera A Scientific Journal*, 30(1), 1–10.
- Wardhana, M. W. (2020). *Pengaruh Salinitas Terhadap Lama Waktu Dan Daya Tetas Artemia*.

Perhitungan Pembuatan Larutan DMSO

1. Pembuatan DMSO 1% dari DMSO 100% sebanyak 100 ml

$$N_1.V_1 = N_2.V_2$$

$$100\%.V_1 = 1\%.100$$

$$V_1 = 100\% : 100\%$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

(1 ml DMSO 100% ditambahkan dengan 99 ml aquadest)

2. Pembuatan Larutan DMSO 10%

Pembuatan larutan DMSO 10% dilakukan dengan metode pengenceran.

Diambil larutan DMSO 100%, lalu dilakukan pengenceran dengan rumus :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$10 \text{ ml} \times 100 = V_2 \times 10$$

$$V_2 = 1000/10$$

$$V_2 = 100 \text{ ml}$$

Keterangan :

V_1 = Volume awal

N_1 = Konsentrasi zat awal

V_2 = Volume setelah pengenceran

N_2 = Konsentrasi setelah pengenceran