

**UJI BRINE SHRIMP LETHALITY TEST (BSLT) EKSTRAK ETANOL 96% DAUN ANDE-ANDE LUMUT (*Selaginella doederleinei*)*****Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) of 96% Ethanol Extract of Ande-ande Lumut (*Selaginella doederleinei*) Leaves***Yunita Difa Prasticha<sup>1</sup>, Surahmaida<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Akademi Farmasi Surabaya\*Email : [fahida1619@gmail.com](mailto:fahida1619@gmail.com)**Abstract**

*Selaginella doederleinei* is a fern plant that is efficacious for treating coughs, pneumonia and broken bones. Leaves are the primary medicinal parts. However, there has been no research regarding the toxicity of *Selaginella doederleinei* leaves. This study aims to evaluate potential toxicity of 96% ethanol extract of *Selaginella doederleinei* leaves against shrimp larvae (*Artemia salina* Leach) using the Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) method. The toxicity value is shown by the LC<sub>50</sub> value. This research method includes the extraction stage, larvae hatching stage, stock solutions and concentration dilutions of the extract preparation, toxicity test and LC<sub>50</sub> value calculation. The toxicity test using 10 *Artemia salina* shrimp larvae were exposed to each test concentration (0 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm) in triplicate. Larval mortality was assessed after 24 hours to calculate mortality percentage and LC<sub>50</sub>. The results showed that the LC<sub>50</sub> value for the 96% ethanol extract of *Selaginella doederleinei* was 12.0221 ppm, indicating very toxic. It can be concluded that *Selaginella doederleinei* leaves exhibits significant toxicity to brine shrimp and potential to be developed as a raw material for anti-cancer drugs.

**Keywords:** *Artemia salina*, brine shrimp lethality test, mortality, *Selaginella doederleinei*, toxicity.

**Abstrak**

Ande-ande lumut (*Selaginella doederleinei*) merupakan tanaman paku yang berkhasiat untuk mengobati batuk, radang paru dan patah tulang. Bagian tanaman ande-ande lumut yang berkhasiat adalah daunnya. Namun belum ada penelitian mengenai toksisitas daun ande-ande lumut. Penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi ketoksikan ekstrak etanol 96% daun ande-ande lumut terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach) menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Nilai toksisitas ditunjukkan dengan nilai LC<sub>50</sub>. Metode penelitian ini meliputi tahap ekstraksi, tahap penetasan larva, tahap pembuatan larutan induk dan pengenceran konsentrasi, uji toksisitas dan perhitungan nilai LC<sub>50</sub>. Uji toksisitas menggunakan 10 larva udang *Artemia salina* dimasukkan ke dalam tiga replikasi untuk setiap konsentrasi uji, yaitu 0 ppm (sebagai kontrol), 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm. Setelah 24 jam, dihitung jumlah larva udang yang mati untuk perhitungan persentase kematian dan nilai LC<sub>50</sub>. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol 96% daun ande-ande lumut (*Selaginella doederleinei*) menghasilkan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 12,0221 ppm dan bersifat sangat toksik. Dapat disimpulkan bahwa ande-ande lumut berpotensi dikembangkan sebagai bahan baku obat anti kanker.

**Kata kunci:** *Artemia salina*, brine shrimp lethality test, kematian, *Selaginella doederleinei*, toksisitas.

## PENDAHULUAN

Tanaman obat mendapat perhatian besar dalam mengatasi permasalahan kesehatan. Saat ini minat penelitian terhadap penelitian tanaman berkhasiat obat semakin meningkat. Tanaman obat merupakan sumber daya hayati terkaya untuk obat tradisional, suplemen makanan, nutrasetikal, farmasi dan bahan kimia untuk obat sintesis. Obat herbal semakin diminati masyarakat sebagai alternatif pengobatan karena masyarakat percaya bahwa obat herbal minim efek samping dibandingkan dengan obat kimiawi. Hal ini yang menyebabkan pasar dan permintaan terhadap obat herbal menjadi meningkat (Kabubii et al., 2015).

Untuk memastikan keamanan dan efektivitas tanaman obat, diperlukan pengujian farmakologi dan toksikologi seperti uji toksisitas akut, dosis letal dan IC<sub>50</sub> (Konan et al., 2022). Salah satu tanaman obat yang akan diteliti toksisitasnya pada penelitian ini adalah ande-ande lumut (*Selaginella doederleinei*).

Ande-ande lumut adalah anggota famili Selaginellaceae dan umumnya dikenal dengan tanaman paku cakar ayam, rumput solo atau cemara kipas gunung (Sutomo & Fardila, 2013). Di Cina, tanaman ini dikenal dengan sebutan “*da ye cai*” dan “*shi shang bai*”. Ande-ande lumut berkhasiat untuk mengobati penyakit kardiovaskular, sakit tenggorokan, kanker nasofaring, kanker paru-paru dan tumor trofoblastik (Muema et al., 2022).

Sampai saat ini, publikasi mengenai toksisitas ande-ande lumut (*Selaginella doederleinei*) belum ditemukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi toksisitas ande-ande lumut terhadap larva udang *A. salina* dengan metode BSLT dan diharapkan dapat dijadikan bahan referensi tentang potensi ande-ande lumut sebagai antikanker.

## METODE

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental untuk mengetahui dan menganalisa toksisitas daun ande-ande lumut yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 96% terhadap larva udang (*A. salina*) dengan metode BSLT. Uji toksisitas ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Surabaya.

### Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk halus daun ande-ande lumut yang diperoleh di UPT Laboratorium Materia Medica

Batu, Jl. Johor No. 58 Malang. Hewan uji yang digunakan adalah larva udang *Artemia salina*.

### Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Ande-ande Lumut

Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi. Sebanyak 100 g serbuk halus daun ande-ande lumut dimasukkan ke dalam toples kaca, lalu ditambahkan 1000 mL pelarut etanol 96%. Diaduk rata dan direndam selama 72 jam. Selama proses maserasi, dilakukan pengadukan secara berkala agar ekstrak tercampur rata dengan pelarut dan mempercepat reaksi antara pelarut dan senyawa yang terkandung di dalamnya. Setelah 3 hari, disaring dengan kain blacu dan filtratnya diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40 °C hingga didapatkan ekstrak kental.

### Proses Penetasan Hewan Uji *A. Salina*

Disiapkan toples plastik sebagai wadah penetasan larva udang (*A. salina*). Sebanyak 0,25 mg telur larva udang dimasukkan ke dalam toples yang telah berisi 500 ml air laut. Larva yang digunakan untuk uji toksisitas adalah larva yang berumur 48 Jam.

### Uji Bebas Etanol

Untuk memastikan ekstrak daun ande-ande lumut ini bebas dari pelarut, meskipun sudah di-evaporasi, maka perlu dilakukan uji bebas etanol. Sebanyak 0,1 g ekstrak dilarutkan dengan 1 mL asam asetat glasial (CH<sub>3</sub>COOH) dan 1 mL asam sulfat pekat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), kemudian dipanaskan. Ekstrak dinyatakan bebas etanol apabila tidak tercium bau ester wangi (Alydrus et al., 2023).

### Pembuatan Larutan Induk

Untuk pembuatan larutan induk 1000 ppm dengan cara menimbang 100 mg ekstrak etanol 96% daun ande-ande lumut dan ditambahkan 30 tetes DMSO 1% agar terlarut sempurna. Setelah larut, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur dan di-adkan air laut 100 ml.

### Pembuatan Konsentrasi Uji

Dari larutan induk tersebut kemudian dilakukan pengenceran untuk konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm. Kontrol negatif (0 ppm) yaitu air laut tanpa penambahan larutan uji.

### Uji Toksisitas

Uji toksisitas ini dilakukan berdasarkan metode (Ntungwe et al., 2020) dengan modifikasi. Ada 2 kelompok perlakuan pada uji

toksistas yaitu kelompok uji (konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm) dan kelompok kontrol (sebagai pembanding). Tiap konsentrasi disiapkan 3 tabung reaksi. Total ada 18 tabung reaksi dan 180 larva *A. salina* untuk uji BSLT.

Sebanyak 1 mL larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan air laut hingga 10 mL, lalu dimasukkan 10 larva *Artemia salina*. Untuk kontrol, hanya ada 10 mL air laut dan 10 larva *A. salina* tanpa penambahan larutan uji. Pemaparan dilakukan selama 24 jam, diamati dan dihitung jumlah larva *A. salina* yang mati.

### Analisis Toksisitas

Efek toksik dilakukan dengan cara menghitung persentase (%) kematian larva *A. salina* dalam 24 jam pada setiap konsentrasi zat yang diuji. Kriteria standar larva yang mati ditandai dengan tidak adanya pergerakan.

Persentase kematian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{U - K}{S} \times 100\%$$

Dimana:

U = jumlah larva uji yang mati

K = jumlah larva kontrol yang mati

S = jumlah larva uji

Setelah mengetahui nilai % kematian, kemudian dicari nilai probit melalui tabel probit dan diregresikan secara linier untuk mendapatkan nilai LC50. Nilai LC50 yang diperoleh kemudian diklasifikasikan ketoksikannya berdasarkan Hamidi et al., (2014) dan Karchesy et al., (2016) yang disajikan pada Tabel 1 sebagai berikut:

**Tabel 1.** Ketosikan senyawa berdasarkan nilai LC<sub>50</sub>

Nilai LC <sub>50</sub> (mg/mL)	Kategori
> 1000	Non toksik
500 - 1000	Rendah
100 – 500	Sedang
> 100	Sangat toksik

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui toksistas dari ande-ande lumut berdasarkan kemampuannya membunuh larva udang (*Artemia salina* Leach) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Hasil maserasi daun ande-ande lumut yang diekstraksi dengan pelarut etanol 96% didapatkan ekstrak sebesar 6,19 g. Sebelum uji toksistas, dilakukan uji bebas

etanol. Uji bebas etanol ini bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak bebas dari etanol sebelum digunakan untuk uji toksistas yang digunakan benar-benar tidak menghasilkan data yang bias (Alydrus et al., 2023). Hasil uji bebas etanol menunjukkan bahwa ekstrak tersebut telah bebas dari pelarut etanol.

Selanjutnya, dilakukan pembuatan larutan induk dan pengenceran konsentrasi. Agar ekstrak terlarut sempurna, digunakan DMSO sebagai pelarut utama dalam uji BSLT. Adanya perbedaan kepolaran mengakibatkan ekstrak tidak larut sempurna apabila hanya menggunakan air laut. DMSO bekerja sebagai surfaktan (senyawa yang memiliki sifat hidrofilik dan hidrofobik), yang menurunkan tegangan permukaan sehingga dapat membantu pelarutan ekstrak (Amarulloh & Lukmayani, 2022).

Dalam uji toksistas, DMSO yang digunakan adalah DMSO 1% karena aman (tidak menghasilkan efek toksik pada *Artemia salina*) dan meningkatkan kelarutan ekstrak. Pada kontrol hanya menggunakan air laut untuk memastikan bahwa kematian larva udang disebabkan dari senyawa kimia dari ekstrak tanaman dan bukan dari air laut (Marzuki et al., 2019; Wulansari et al., 2022).

BSLT digunakan sebagai uji pendahuluan atau skrining awal untuk mendeteksi aktivitas biologis dari senyawa yang berasal dari tanaman ataupun sintetis. Hasil uji toksistas dari metode ini berkorelasi dengan aktivitas sitotoksik terhadap antikanker dan anti-tumor. Keuntungan dari metode BSLT yaitu sederhana (mudah dilakukan), efisien, cepat, hemat biaya, tidak membutuhkan peralatan yang khusus, dan hanya membutuhkan sedikit sampel uji (2-20 mg) (Sarah et al., 2017).

*Artemia salina* digunakan sebagai hewan uji pada metode BSLT karena memiliki kepekaan yang tinggi terhadap senyawa kimia baik dari logam berat maupun tanaman obat (Konan et al., 2022). Selain itu, penggunaan *A. salina* dalam jumlah yang banyak (replikasi 3 kali) memungkinkan analisis statistik yang kuat terhadap sampel uji (Sarah et al., 2017).

Larva *A. salina* yang digunakan untuk uji BSLT harus berumur 48 jam karena pada fase tersebut larva aktif bergerak dan memiliki tingkat pembelahan mitosis yang tinggi. Tingginya aktivitas mitosis ini menjadikan larva *A. salina* mirip dengan sel kanker sehingga cocok untuk mengevaluasi efek senyawa kimia terhadap pertumbuhan sel kanker (Andini et al., 2021). Selain itu, larva *A. salina* yang berumur 48 jam telah memiliki organ-organ yang lengkap dan

tingkat kepekaan yang tinggi terhadap zat-zat kimia sehingga memungkinkan deteksi efek sitotoksik dengan akurat (Ntungwe et al., 2020). Hasil uji toksisitas yang dilakukan selama 24 jam, didapatkan efek toksik ekstrak etanol 96% daun

ande-ande lumut berdasarkan persentase kematian larva udang *A. salina*. Adapun hasil persentase kematian larva udang (*A. salina*) disajikan pada Tabel 2 berikut:

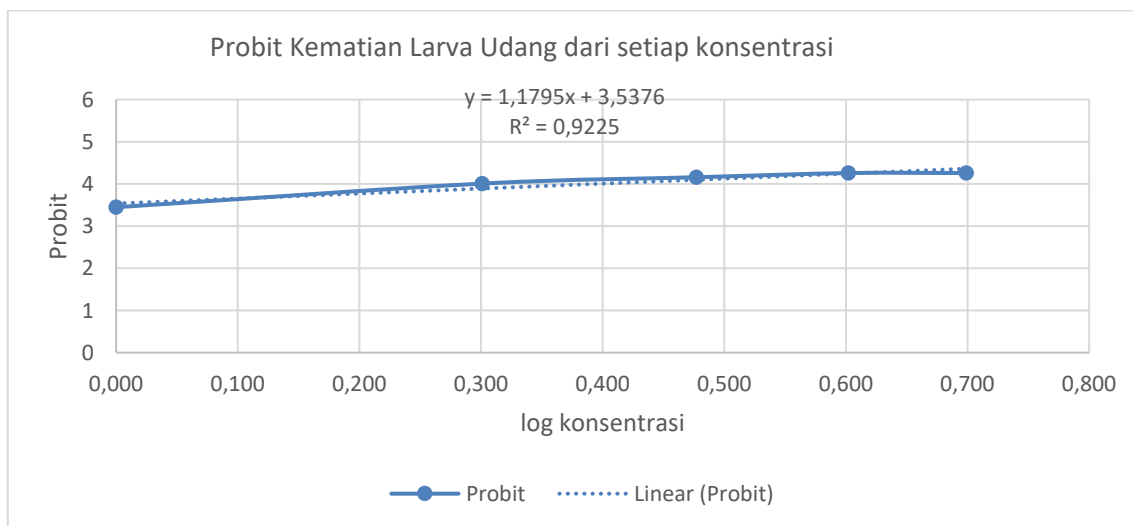
**Tabel 2.** Hasil uji toksisitas ekstrak etanol 96% daun ande-ande lumut

Replikasi	Jumlah larva udang yang mati					
	0 ppm	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm
1	1	1	3	4	2	4
2	1	1	2	2	3	3
3	0	2	2	2	4	2
Total	2	4	7	8	9	9
Rata-rata	0,6	1,33	2,33	2,66	3	3
% kematian	0,66	6,66	16,66	20	23,33	23,33

Pada Tabel 2 menunjukkan nilai persentase kematian yang sama (tidak mengalami peningkatan kematian) pada konsentrasi 4 ppm dan 5 ppm. Hal ini disebabkan pada konsentrasi tersebut merupakan batas maksimal konsentrasi yang dapat membunuh larva *A. salina*. Semakin tinggi konsentrasi maka kematian larva meningkat. Kandungan senyawa kimia meningkat seiring dengan tingginya konsentrasi dan kemungkinan hal itulah yang menyebabkan respon kematian *A. salina* yang sama.

Pada kontrol, terdapat dua larva udang yang mati kemungkinan pada saat proses pemindahan larva dari wadah penetasan ke dalam tabung uji,

larva mengalami stress sehingga pada saat uji toksisitas mengalami kematian di tabung kontrol. Dari data tersebut kemudian dilakukan perhitungan nilai LC<sub>50</sub> menggunakan metode analisis probit dengan Microsoft Excel. *Lethal Concentration 50* (LC<sub>50</sub>) adalah konsentrasi zat yang menyebabkan kematian 50% organisme uji dalam 24 jam. Nilai LC<sub>50</sub> merupakan indikator toksisitas suatu zat, dimana semakin rendah nilai LC<sub>50</sub> maka semakin toksik zat tersebut (Ntungwe et al., 2020). Adapun hubungan antara log konsentrasi dan nilai probit yang menyatakan % kematian larva udang disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Grafik nilai probit terhadap log konsentrasi dari ekstrak daun ande-ande lumut

Nilai LC<sub>50</sub> pada ekstrak etanol 96% daun ande-ande lumut sebesar 12,0221 ppm dan bersifat sangat toksik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun ande-ande lumut (*Selaginella doederleinei*) berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat anti kanker. Menurut Sarah et al., (2017) dan Ntungwe et al., (2020), nilai LC<sub>50</sub> yang dihasilkan pada uji BSLT ini berkorelasi dengan aktivitas sitotoksik

terhadap antikanker dan anti tumor. Semakin rendah nilai LC<sub>50</sub> maka semakin toksik zat tersebut terhadap *A. salina* (yang dianalogikan sebagai sel kanker/sel tumor).

Mekanisme kematian larva udang selama pengujian toksisitas berkaitan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder pada ande-ande lumut. Senyawa metabolit sekunder bekerja sebagai racun perut (*stomach*

poisoning), dengan cara menghambat kemampuan larva udang untuk makan (Marzuki et al., 2019). Ande-ande lumut (*Selaginella doederleinei*) mengandung senyawa alkaloid dan flavonoid (Brad et al., 2017). Dua senyawa kimia utama dalam ekstrak ande-ande lumut tersebut memiliki mekanisme berbeda dalam membunuh larva *Artemia salina*.

Senyawa flavonoid menghambat aktivitas enzim pencernaan dan penyerapan makanan pada larva, sehingga larva tidak dapat mencerna dan menyerap nutrisi dengan baik. Hal ini menyebabkan larva kelaparan dan mati. Flavonoid juga bertindak sebagai racun perut pada larva, sehingga menyebabkan kerusakan pada sistem pencernaan dan kematiannya. Alkaloid bersifat racun bagi larva ketika ditelan. Racun ini dapat mengganggu sistem saraf larva, sehingga larva kehilangan kemampuan untuk mengenali dan merasakan makanannya. Akibatnya larva tidak dapat makan dan mati kelaparan (Cahaya et al., 2023)

## KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa daun ande-ande lumut (*Selaginella doederleinei*) yang diekstraksi dengan pelarut etanol 96% memiliki aktivitas sitotoksik terhadap larva udang *Artemia salina* dan dapat dikembangkan sebagai obat anti kanker. Nilai LC<sub>50</sub> yang diperoleh pada daun ande-ande lumut sebesar 12,0221 ppm dan bersifat sangat toksik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alydrus, L. N., Gama, S. I., & Rijai, L. (2023). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana*) terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 17, 38–43. <https://doi.org/10.25026/mpc.v17i1.688>
- Amarulloh, W. K., & Lukmayani, Y. (2022). Aktivitas Sitotoksik Tajuk Gandasoli Hutan (*Hedychium roxburghii* Blume). *Jurnal Riset Farmasi*, 1(2), 133–140. <https://doi.org/10.29313/jrf.v1i2.568>
- Andini, A., Prayekti, E., Triasmoro, F., Nur Endah Kamaliyah, D. (2021). Pengaruh Penggunaan Jenis Pelarut Dalam Uji Sitotoksistas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) Pada Wound Dressing Kolagen-Kitosan. *Al-Kimiya*, 8(1), 15-20.
- Brad, K., Zhang, Y., Yang, X., & Wang, T. (2017). Identification of chemical constituents of *Selaginella doederleinii* Hieron. *Advances in Engineering Research (AER)*, 143, 455-459.
- Cahaya, D. N. R., Abdulkadir, W. S., & Hasan, H. (2023). Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Kulit Terong Ungu (*Solanum melongena* L.) Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 4(1), 202-210. <https://doi.org/10.37311/jsscr.v4i1.13630>
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., & Panovska, K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60(1), 9-18.
- Kabubii, Z. N., Mbaria, J. M., & Mbaabu, P. M. (2015). Phytochemical Composition and Brine Shrimp Cytotoxicity Effect of *Rosmarinus officinalis*. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology and Sciences (ASRJETS)*, 11(1), 127-135.
- Karchesy, Y. M., Kelsey, R. G., Constantine, G., & Karchesy, J. J. (2016). Biological screening of selected Pacific-Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. *SpringerPlus*, 5(510), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2145-1>
- Konan, A. M. L., Golly, K. J., Kra, A. K. M., Adima, A. A., & Lohoues, E. E. C. (2022). Phytochemical Screening and Toxicity Assessment of *Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv. (Poaceae) Raw Extracts with Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *Journal of Biosciences and Medicines*, 10(08), 153–171. <https://doi.org/10.4236/jbm.2022.108014>
- Marzuki, A., Rahman, L., & Mamada, S. S. (2019). Toxicity test of stem bark extract of banyuru (*Pterospermum celebicum* miq.) using BSLT (*brine shrimp lethality test*) and cream irritation test. *Journal of Physics: Conference Series*, 1341. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1341/7/072018>
- Muema, F. W., Liu, Y., Zhang, Y., Chen, G., & Guo, M. (2022). Flavonoids from *Selaginella doederleinii* Hieron and Their Antioxidant and Antiproliferative Activities. *Antioxidants*, 11(1189), 1-16. <https://doi.org/10.3390/antiox11061189>
- Ntungwe N, E., Domínguez-Martín, E. M., Roberto, A., Tavares, J., Isca, V. M. S., Pereira, P., Cebola, M.-J., & Rijo, P. (2020). *Artemia* species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. *Current Pharmaceutical Design*, 26, 2892–2908. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200406083035>

- Sarah, Q. S., Anny, F. C., & Misbahuddin, M. (2017). Brine shrimp lethality assay. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12, 186–189.  
<https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.32796>
- Sutomo, S., & Fardila, D. (2013). Autekologi Tumbuhan Obat *Selaginella doederleinii* Hieron Di Sebagian Kawasan Hutan Bukit Pohen Cagar Alam Batukahu, Bedugul Bali. *Jurnal Penelitian Hutan Dan Konservasi Alam*, 10(2), 153–161.  
<https://doi.org/10.20886/jphka.2013.10.2.153-161>
- Wulansari, D., Wulandari, D. D., & Krisdayanti, A. (2022). Comparative Study of In-Vitro Toxicity of Raw Honey and Fermented Honey Using the BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) Method. *Medical Technology and Public Health Journal*, 6(2), 148–156.  
<https://doi.org/10.33086/mtphj.v6i2.3477>