

Toxicity Test of Cat Whiskers (*Orthosiphon stamineus*) and Miana (*Coleus artropurpureus*) Leaves Against *Artemia salina* Leach Using BSLT

Surahmaida^{1*}

¹Akademi Farmasi Surabaya, Surabaya, Indonesia

Article History

Received : November 20th, 2022

Revised : December 28th, 2022

Accepted : January 08th, 2023

*Corresponding Author:

Surahmaida,

Akademi Farmasi Surabaya,

Surabaya, Indonesia;

Email: fahida1619@gmail.com

Abstract: Medicinal plants are a good source of therapeutic drugs because they contain phytochemical compounds. Cat's whiskers (*Orthosiphon stamineus*) and miana (*Coleus artropurpureus*) are plants that are widely used as herbal medicines. However, there are no studies related to toxicology to ensure its safety. The aim of this study was to determine the toxicity of 96% ethanol extract of cat whiskers and miana leaves to shrimp (*Artemia salina* Leach) larvae. Toxicity test was carried out using the *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) method with 48 hours old *Artemia salina* shrimp larvae. The concentration of the extract used was 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm and 5 ppm. The results of the toxicity test showed that the 96% ethanol extract of cat's whiskers leaves had an LC₅₀ value of 8.0855 ppm, while the 96% ethanol extract of miana leaves had an LC₅₀ value of 4.7067 ppm. Based on the results of the study, it can be concluded that cat's whiskers and miana leaves have the potential to be developed as candidates for anticancer drugs.

Keywords: *Artemia salina* leach, cat whiskers leaves; miana leaves; toxicity

Pendahuluan

Pencarian obat baru yang berasal dari tanaman menjadi perhatian bagi peneliti di seluruh dunia. Tanaman kaya akan kandungan senyawa metabolit sekunder yang terbukti memiliki aktivitas biologi dan farmakologi (Gadir, 2012). Salah satunya adalah tanaman dari famili Lamiaceae. Famili ini terkenal akan kandungan minyak atsiri dan minyak atsiri tersebut digunakan di industri farmasi, parfum, kosmetika dan makanan. Selain itu, memiliki aktivitas biologi dan farmakologi seperti insektisida, *repellent* (penolak serangga), antibakteri, antiparasit usus, karminatif, antiemetik, antiflu, pengobatan luka bakar, sakit kepala dan kolik (Ramos *et al.*, 2017).

Tanaman kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan miana (*Coleus artropurpureus*) termasuk anggota famili Lamiaceae yang banyak digunakan sebagai tanaman obat. Saat ini, penelitian mulai difokuskan pada farmakologi dan toksisitas tanaman obat yang digunakan oleh manusia. Hal ini sangat penting untuk mendapatkan pengobatan yang aman dengan produk tanaman (Hamidi *et al.*, 2014). Tanaman

obat seperti kumis kucing dan miana yang memiliki toksisitas berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) telah diterapkan sebagai teknik bioassay alternatif untuk menguji toksisitas ekstrak tanaman, toksisitas logam berat, toksisitas Cyanobacteria dan alga, sitotoksitas bahan gigi, toksisitas nanopartikel serta penyaringan hasil alam laut (Hamidi *et al.*, 2014). Metode BSLT menggunakan larva udang (*Artemia salina* Leach) sebagai hewan uji. Pengerjaan metode ini cepat karena waktu pengamatan hanya 24 jam, mudah, tidak memerlukan peralatan dan keahlian khusus, sederhana (tanpa teknik aseptis). Metode ini mudah dipahami dan membutuhkan jumlah sampel minimal yang dibuat dengan memaparkan larva ke sampel uji dalam air laut (larutan garam) (Turan & Mammadov, 2021).

Ekstrak uji dikatakan memiliki efek toksik apabila nilai LC₅₀ di bawah 1000 ppm, dan dikatakan tidak toksik apabila nilai LC₅₀ di atas 1000 ppm (Nguta *et al.*, 2012). Hasil penelusuran pustaka, belum ada penelitian tentang pengujian toksisitas daun kumis kucing dan daun miana. Oleh karena itu, maka penelitian ini bertujuan

untuk mengetahui toksisitas daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan daun miana (*Coleus artropurpureus*) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach) dengan metode BSLT.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Akademi Farmasi Surabaya, Jl. Ketintang Madya No. 81 Surabaya. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan April-Mei 2022.

Alat dan bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk halus daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*), serbuk halus daun miana (*Coleus artropurpureus*), larva udang (*Artemia salina* Leach) sebagai hewan uji, dan pelarut etanol 96%.

Alat yang digunakan toples kaca, corong, batang pengaduk, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu ukur, gelas beker, *vortex*, *rotary evaporator*, toples plastik, gelas arloji, neraca analitik, pipet tetes, pipet volume, gelas ukur, dan cawan porselen.

Ekstraksi

Serbuk halus daun kumis kucing dan serbuk halus daun miana diambil sebanyak 100 gr. Kemudian, dimasukkan ke dalam toples kaca, dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebesar 1000 mL. Selanjutnya, diaduk rata hingga rata homogen dan ditutup erat dan dilapisi aluminium foil. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi selama 24 jam. Pengadukan dilakukan sesekali agar tetap homogen dan tidak terjadi penggumpalan serbuk. Setelah 24 jam, penyaringan menggunakan corong dan kain blacu untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50 °C hingga didapatkan ekstrak kental. Besar sampel yang digunakan pada masing-masing ekstrak tersebut sebesar 10 mg.

Penetasan larva *Artemia salina*

Telur *Artemia salina* sebanyak 25 mg dimasukkan ke dalam wadah toples plastik transparan yang berisi 500 ml air laut dan

diinkubasi selama 48 jam. Kemudian, telur *Artemia salina* akan menetas dan menjadi larva. Larva *Artemia salina* yang digunakan untuk uji toksisitas berumur 48 jam karena pada umur tersebut anggota tubuh larva sudah lengkap dibandingkan pada saat larva itu menetas dan paling sensitif terhadap bahan uji. Selain itu, dipilih larva *Artemia salina* yang bergerak aktif (Economou *et al.*, 2019).

Pembuatan larutan induk

Pembuatan larutan induk (stok) 100 ppm, ekstrak kental daun kumis kucing miana ditimbang sebanyak 10 mg pada gelas arloji secara kuantitatif. Selanjutnya, dilarutkan dengan sebagian air laut dalam tabung reaksi. Pengadukan menggunakan alat *vortex* agar ekstrak kental daun kumis kucing terlarut sempurna dalam air laut. Setelah terlarut, dimasukkan ke dalam labu ukur, lalu di-ad-kan 100 ml air laut. Prosedur yang sama dilakukan untuk proses pembuatan larutan induk pada ekstrak kental daun miana. Konsentrasi untuk pembuatan larutan induk pada persamaan 1÷.

$$100 \text{ ppm} = \frac{100 \text{ mg}}{1 \text{ Liter}} \quad (1)$$

Pembuatan konsentrasi uji

Larutan uji dibuat dalam konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm dengan proses pengenceran dari larutan induk. Rumus perhitungan untuk pembuatan konsentrasi uji menggunakan rumus pada persamaan 2÷.

$$V1.M1 = V2.M2 \quad (2)$$

Keterangan:

V1 = volume awal M1 = konsentrasi awal
V2 = volume akhir M2 = konsentrasi akhir

Contoh:

Pembuatan Konsentrasi 1 ppm

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 100 \text{ ppm} = 10 \text{ ml} \times 1 \text{ ppm}$$

$$V1 = \frac{10 \text{ mL} \times 1 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}}$$

$$= 0,1 \text{ mL larutan induk add } 9,9 \text{ mL air laut}$$

Kontrol, tabung reaksi hanya berisi larva udang *Artemia salina* tanpa penambahan larutan uji.

Pelaksanaan uji toksisitas metode BSLT

Pengujian toksisitas ekstrak daun kumis kucing dan ekstrak daun miana terhadap larva udang *Artemia salina* menggunakan metode BSLT, disiapkan tabung reaksi sebanyak 18 buah. Tiap konsentrasi membutuhkan 3 tabung reaksi (15 tabung reaksi untuk 5 konsentrasi masing-masing direplikasi 3 kali) dan 3 tabung reaksi untuk kontrol.

Perlakuan konsentrasi 10 ppm, tabung reaksi yang berisi 9,9 ml air laut dan 10 ekor larva udang *Artemia salina* umur 48 jam (bergerak aktif) yang dipilih secara acak, kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan ekstrak. Sedangkan untuk perlakuan kontrol (0 ppm), tabung reaksi hanya berisi 10 ml air laut dan 10 ekor larva udang *Artemia salina* umur 48 jam (bergerak aktif) tanpa adanya penambahan larutan ekstrak. Kemudian dilakukan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang dan pencahayaan yang cukup. Setelah 24 jam, dihitung jumlah larva yang mati.

Analisa data

Efek toksisitas dianalisis dari data kematian larva udang *Artemia salina* dengan menghitung persen kematian tiap konsentrasi. Hasil dari data tersebut dianalisis menggunakan analisis probit untuk menentukan nilai LC_{50} ekstrak etanol 96% daun kumis kucing dan ekstrak etanol 96% daun miana. Menghitung % kematian dari larva udang *Artemia salina* pada masing-masing konsentrasi (1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm). Data jumlah larva yang mati dari 3 replikasi dijumlah dan dirata-rata, lalu dihitung persentase kematian larva *Artemia salina* menggunakan rumus pada persamaan 3÷.

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\% \quad (3)$$

Nilai probit (Y) dari tiap kelompok perlakuan ditentukan melalui tabel probit pada data persentase kematian. Konsentrasi dibuat log konsentrasi (X), sehingga didapatkan persamaan garis lurus hubungan antara Y (nilai probit dari persentase kematian) dengan X (log konsentrasi), yaitu $Y = AX + B$. Nilai LC_{50} diperoleh dari persamaan garis lurus dengan memasukkan nilai 5 (probit 50% kematian hewan uji) sebagai Y, sehingga dihasilkan X sebagai nilai log konsentrasi. Antilog nilai X tersebut merupakan

nilai LC_{50} . Nilai LC_{50} yang diperoleh kemudian dikategorikan ketoksikannya.

Hasil dan Pembahasan

Artemia yang digunakan untuk studi aktivitas biologis terdiri dari 3 spesies diantaranya *Artemia franciscana*, *Artemia salina*, dan *Artemia urmiana*. Ketiga spesies larva udang tersebut digunakan sebagai organisme uji dalam ekotoksikologi karena memiliki sensitivitas yang tinggi, ketersediaan untuk dibeli, transformasi yang mudah dari penetasan menjadi siklus larva, mudah dipelihara, dan dapat diamati dengan mata telanjang. Namun, lebih dari 90% penelitian menggunakan *Artemia salina* adalah spesies yang paling banyak digunakan sebagai organisme uji eksperimental (Turan & Mammadov, 2021).

Metode BSLT pada penelitian ini digunakan untuk skrining (uji pendahuluan) toksisitas dalam proses penemuan obat dari tanaman obat Indonesia, yaitu daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan daun miana (*Coleus artropurpureus*). Tanaman kumis kucing dan miana dari famili Lamiaceae yang terkenal akan bau khas aromatik. Daun kumis kucing dikonsumsi sebagai teh herbal dan secara tradisional digunakan untuk mengobati penyakit kandung kemih dan ginjal (karena efek diuretiknya yang kuat), detoksifikasi, pereda kaku sendi dan radang sendi, rematik, asam urat, mengobati radang selaput lendir hidung, menghilangkan batu kandung kemih dan mengobati diabetes melitus (George *et al.*, 2015).

Kumis kucing mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, terpenoid dan minyak atsiri (Surahmaida & Umarudin, 2019). Miana (*Coleus artropurpureus*) merupakan tanaman herba tahunan dan dijadikan sebagai tanaman hias karena memiliki keanekaragaman warna dan bentuk daun yang mencolok dan menarik (Ningsih & Rohmawati, 2019). Daun miana yang berwarna-warni selain dimanfaatkan sebagai tanaman hias, juga digunakan sebagai tanaman obat untuk mengatasi dermatitis (Respita *et al.*, 2019), penyakit bronkhitis, asam urat, gangguan pencernaan, gigitan hewan (Suva *et al.*, 2016), mengobati bisul, diare dan cacingan (Ridwan *et al.*, 2010).

Uji toksisitas dengan metode BSLT sangat penting sebagai uji pendahuluan sifat antikanker. Jika hasil tes menunjukkan toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina*, maka uji toksisitas dapat dilanjutkan pada sel kanker manusia. Toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* dapat dianalogikan dengan toksisitas terhadap sel mamalia (Hamrun *et al.*, 2020).

Ekstrak daun kumis kucing dan ekstrak daun miana yang diperoleh kemudian dilakukan

pengenceran dan dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm. Setelah dilakukan uji toksisitas selama 24 jam pada ekstrak daun kumis kucing dan ekstrak daun miana terhadap larva udang *Artemia salina*, diperoleh data rata-rata persentase kematian larva udang *Artemia salina* (ditampilkan pada Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Persentase Mortalitas Larva Udang *Artemia salina*

Ekstrak	Kons.	Log Kons (X)	Probit (Y)	% Mortalitas	Mortalitas
Daun kumis kucing	1	0,00	3,45	6 %	1
	2	0,30	4,05	17 %	5
	3	0,48	4,39	27 %	9
	4	0,60	4,56	33 %	12
	5	0,70	4,75	40 %	16
Daun miana	1	0,00	3,12	3 %	1
	2	0,30	4,05	17 %	5
	3	0,48	4,48	30 %	9
	4	0,60	4,75	40 %	12
	5	0,70	5,08	53 %	16

Persentase kematian larva *Artemia salina* terendah terdapat pada konsentrasi 1 ppm yaitu 6,67% (pada ekstrak daun kumis kucing) dan 3,3% (pada ekstrak daun miana) (Tabel 1). Persentase mortalitas larva *Artemia salina* yang tertinggi terdapat pada konsentrasi konsentrasi 5 ppm yaitu 40% (pada ekstrak daun kumis kucing) dan 53% (pada ekstrak daun miana). Sedangkan pada kontrol (0 ppm), tidak ada mortalitas (kematian) pada larva *Artemia salina*. Hal ini disebabkan pada kontrol hanya berisi air laut dan larva *Artemia salina* (tanpa penambahan larutan uji).

Persamaan garis lurus hubungan antara nilai probit dari persentase kematian larva (Y) (Tabel 1) dengan log konsentrasi (X) menggunakan rumus $Y=aX+b$. Hasil perhitungan diperoleh nilai LC_{50} dari ekstrak etanol 96% daun kumis kucing sebesar 8,0855 ppm, dan nilai LC_{50} dari ekstrak etanol 96% daun miana sebesar 4,7067 ppm (Tabel 3).

Analisa Data

Nilai LC_{50} dari hasil uji BSLT yang didapatkan kemudian dikategorikan toksisitasnya menurut Hamidi *et al.* (2014) ditunjukkan pada Tabel 3. Nilai LC_{50} baik pada

ekstrak etanol 96% daun kumis kucing dan ekstrak etanol 96% daun miana bersifat sangat toksik (Tabel 3). Nilai LC_{50} menunjukkan konsentrasi yang dapat membunuh 50% hewan uji dari semua populasi hewan uji yang digunakan (Rasidah & Aulianshah, 2020). Dari hasil penelitian dapat dikatakan bahwa ekstrak daun kumis kucing dan ekstrak daun miana memiliki potensi farmakologis yang menjanjikan untuk dikembangkan sebagai bahan baku antikanker.

Tabel 2. Kategori Toksisitas berdasarkan Nilai LC_{50}

Nilai LC_{50} (ppm)	Kategori
> 1000	Tidak Toksik
500 - 1000	Toksisitas Rendah
100 – 500	Toksisitas Medium
0 – 100	Sangat Toksik

Larva udang (*Artemia sp.*) memiliki membran kulit yang tipis, sehingga kematian terjadi akibat dari efek toksik senyawa metabolit sekunder dapat dianalogikan dengan kematian sebuah sel pada organisme (Hamidi *et al.*, 2014). Senyawa metabolit sekunder adalah senyawa terapeutik untuk pengobatan kanker. Mekanisme kematian larva udang *Artemia salina* terkait dengan kandungan senyawa fitokimia yang

terkandung di dalam daun kumis kucing dan daun miana. Ekstrak berdifusi melalui membran sel larva udang, menyebabkan kerusakan atau modifikasi sitotoksik dan memiliki permeabilitas membran serta mengganggu sistem transfer zat yang dapat mengganggu proses biokimia dan proses fisiologis (Sharififar *et al.*, 2017; Arief *et al.*, 2018). Masuknya zat toksik ke dalam saluran pencernaan larva udang sebagai filter non-selektif dan berinteraksi dengan target (misalnya enzim, lemak, membran sel dan asam nukleat) sehingga mempengaruhi mekanisme tubuh yang pada akhirnya menyebabkan kematian larva udang (Jamil *et al.*, 2016).

Tabel 3. Kategori toksisitas ekstrak

Ekstrak	Nilai LC ₅₀ (ppm)	Kategori
Daun kumis kucing	8,0855	Sangat toksik
Daun miana	4,7067	Sangat toksik

Nilai LC₅₀ menunjukkan korelasi dengan uji toksisitas lain untuk mendeteksi senyawa antikanker dalam bahan alam (Hamidi *et al.*, 2014; Ntungwe *et al.*, 2020). Hal ini semakin menguatkan bahwa tanaman aromatik yang kaya akan kandungan minyak atsiri semakin mendapat perhatian di industri farmasi karena mengandung zat antibakteri, antijamur, antiinflamasi dan antikanker (Oliva *et al.*, 2007). Potensi toksik suatu produk tanaman merupakan salah satu parameter utama yang harus dievaluasi secara ilmiah ketika mempertimbangkan penggunaan bioaktivitasnya sebagai pengobatan (Leite *et al.*, 2009). Uji toksikologi, keefektifan bioassay *Artemia salina* untuk memprediksi toksisitas ekstrak tanaman dievaluasi dengan membandingkan hasil LC₅₀ pada larva *Artemia salina* dengan LD₅₀ pada tikus dan mencit.

Kesimpulan

Uji toksisitas dengan metode BSLT pada ekstrak etanol 96% daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dan ekstrak etanol 96% daun miana (*Coleus arthropurpureus*) yang diperoleh dengan metode maserasi 24 jam memiliki nilai LC₅₀ sebesar 8,0855 ppm dan 4,7067 ppm. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa daun kumis kucing dan daun miana bersifat sangat toksik terhadap larva udang

Artemia salina dan berpotensi sebagai obat antikanker.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu baik secara moral maupun material sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

Referensi

- Arif, M.Z., Zainuddin, N.A., Zakaria, I.S., Wahab, W.N. & Sul'ain, M.D. (2018). Phytochemical Screening and Toxicological Evaluation of *Pyrrhosia piloselloides* Extracts. *International Medical Journal*, 25 (3): 177-180. https://www.researchgate.net/publication/325735927_Phytochemical_screening_and_toxicological_evaluation_of_pyrrhosia_piloselloides_extract.
- Ekonomou, G., Lolos, A., Castritsi-Catharios, J., Neofitou, C., Zouganelis, G.D. & Tsiropoulos, N. (2019). Mortality and effect on growth of *Artemia franciscana* exposed to two common organic pollutants water. *Water*, 11 (8): 1614. pp.1-10.
- Gadir, S.A. (2012). Assessment of Bioactivity of some Sudanese medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4 (12): 5145-5148.
- George, A., Chinnapan, S., Choudhary, Y., Choudhary, V.K., Bommu, P., & Wong, H.J. (2015). Effects of a Proprietary Standardized *Orthosiphon stamineus* Ethanolic Leaf Extract on Enhancing Memory in Sprague Dawley Rats Possibly via Blockade of Adenosine A_{2A} Receptors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2015. 1-9. DOI: <https://dx.doi.org/10.1155/2015/375837>.
- Hamidi, M.R., Jovanova, B. & Panovska, T.K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 1(9): 9-18. DOI: 10.33320/maced.pharm.bull.2014.60.01.0

- 02 .
- Hamrun, N., Nabilah, T., Hasyim, R., Ruslin, M., Dammar, I. & Arianto, M.A. (2020). Toxicity Test of Bioactive Red Alga Extract *Eucheuma spinosum* on Shrimp *Artemia salina* Leach. *Sys Rev Pharm*, 11 (5): 672-676. DOI: <https://dx.doi.org/10.31838/srp.2020.5.94>.
- Jamil, S., Khan, R.A., Afroz, S. & Ahmed, S. (2016). Phytochemistry, brine shrimp lethality and mice acute oral toxicity studies on seed extracts of *Vernonia anthelmintica*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29 (6): 2053-2057. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28375123/>
- Leite, A. M., Lima, E.O., Souza, E.L., Diniz, M.F.F.M., Leite, S.P., Xavier, A.L., & Medeiros, I.A. (2009). Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (4): 842–846. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000600008>.
- Nguta, J.M., Mbaria, J.M., Gakuya, D.W., Gathumbi, P.K., Kabasa, J.D. & Kiama, S.G. (2012). Evaluation of Acute Toxicity of Crude Plant Extracts from Kenyan Biodiversity using Brine Shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). *The Open Conference Proceedings Journal*, 3: 30-34. DOI: 10.2174/2210289201203010030.
- Ningsih, E.P. & Rohmawati, I. (2019). Respon Stek Pucuk Tanaman Miana (*Coleus arthropurpureus* (L.) Benth) Terhadap Pemberian Zat Pengatur Tumbuh. *Jurnal Biologi Tropis*, 19 (2): 277-281. DOI: 10.29303/jbt.v19i2.1246.
- Ntungwe E.N., Martin, E.M.D., 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. DOI: 10.2174/1381612826666200406083035.
- Oliva, M. D. L. M., Gallucci, N., Zygadlo, J. A. & Demo, M. S. Cytotoxic activity of Argentinean essential oils on *Artemia salina*. *Pharmaceutical Biology*, 45 (4): 259-262. <https://doi.org/10.1080/13880200701214557>.
- Ramos, R.D.S., Rodrigues, A.B.L., Farias, A.L.F., Simoes, R.C., Pinheiro, M.T., Ferreira, R.M.A., Barbosa, L.M.C., Souto, R.N.P., Fernandes, J.B., Santos, L.S & Almeida, S.S.M. (2017). Chemical Composition and in Vitro Antioxidant, Cytotoxic, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. (Lamiaceae). *The Scientific World Journal*, 2017: 1-8. DOI:10.1155/2017/4927214.
- Rasidah, R. & Aulianshah, V. (2020). Black Cumin Potential Anticancer Effect of Black Cumin Seed (*Nigella sativa* L.) Extracts as Determined by Cytotoxicity Test Against Larvae of *Artemia salina* Leach Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *International Journal of PharmTech Research*, 13 (2): 25-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.20902/IJPTR.2019.130204>.
- Respita, I.A., Aziz, S. A. & Kurniawati, A. (2019). Correlation of Leaf NPK and Leaf Pigments of *Coleus atropurpureus* L. Benth during Vegetative and Generative Phases. *Journal of Tropical Crop Science*, 6 (3): 174–181. DOI: 10.29244/jtcs.6.03.174-181.
- Ridwan, Y., Satrija, F., Darusman, L. K. & Handharyani, E. (2010). Efektivitas anticestoda ekstrak daun miana (*Coleus blumei* Benth) terhadap cacing *Hymenolepis microstoma* pada mencit. *Media Peternakan*, 33 (1): 6–11. <https://journal.ipb.ac.id/index.php/mediapeternakan/article/view/1226>.
- Sharififar, F., Assadipour, A., Moshafi, M.H., Alishahi, F. & Mahmoudvand, H. (2017). Bioassay Screening of the Essential Oil and Various Extracts of *Nigella sativa* L. Seeds Using Brine Shrimp Toxicity Assay Herbal Medicines Journal, 2 (1): 26-31. DOI: 10.22087/HMJ.V1I2.578.
- Surahmaida & Umarudin. (2019). Studi Fitokimia Ekstrak Daun Kemangi Dan Daun Kumis Kucing Menggunakan Pelarut Metanol. *Indonesian Chemistry*

- And Application Journal (ICAJ)*, 3(1): 1-6.
<https://doi.org/10.26740/icaj.v3n1.p1-6>.
- Suva, M.A., Patel, A.M. & Sharma, N. (2015).
Coleus species : *Solenostemon
scutellarioides*. *Inven. Journals*, Vol.
2015, Issue 2, pp.1–5.
[https://www.researchgate.net/publication/
271700372_Coleus_Species_Solenostem
on_scutellarioides](https://www.researchgate.net/publication/271700372_Coleus_Species_Solenostemon_scutellarioides).
- Turan, M. & Mammadov, R. (2021). Evaluation
of the Toxicity Activity of Bioactive
Compounds of Some Geophytes against
Brine Shrimp (*Artemia salina* L.). *Acta
Aquatica Turcica*, 17 (2): 195-201. DOI:
10.22392/actaquatr.791297