

Skrining toksisitas dengan menggunakan Brine Shrimp Lethality Test (BST) dari daun beberapa species benalu yang secara tradisional digunakan untuk mengobati tumor di Indonesia

Mae Sri Hartati W^{*}, Subagus Wahyuono^{**}

^{*} Bagian Farmasi Kedokteran, Fakultas Kedokteran

^{**} Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Mae Sri Hartati W, Subagus Wahyuono - *Toxicity screening using Brine Shrimp Lethality Test (BST) of some benalu species traditionally utilized to treat tumour in Indonesia.*

Background : Traditionally some benalu species were used to treat tumour in Indonesia. Some research report indicated the present of anti tumour activity, although its toxicity study by BST was not performed yet. It is necessary to observe the toxic level of the benalu leaves and whether they are safe to be consumed.

Objectives : To determine the toxic level of species of benalu leaves {*Dendrophloe pentandra* L. Miq. (1), *Macrosolen tetragonus* (Bl.) Miq. (2 and 7), *Helixanthera parasitica* Lour. (3), *Dendrophloe falcata* (Lf.) Ettings (4), *Dendrophloe constricta* Dans. (5), *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Tiegh. (6)}

Methods : The leaves of benalu were separately extracted with chloroform, followed by methanol. The chloroform and methanol extracts toxicity level were screened using *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) at the dose of 1500, 1000 and 500 ug/ml. The level of the toxicity was determined by counting the death percentage of the *Artemia salina* larvae after 24 hours of adding the extract at the dose indicated. The extract was considered toxic when 100% *A. salina* larvae was killed at the dose < 1000 ug/ml, and the extract was mild toxic when 100% death percentage was observed at the dose of 1500 ug/ml.

Results : Practically all the chloroform extracts were non toxic since they were not able to kill 100% *A. salina* larvae at the dose of 1000 ug/ml. Although when the doses were raised to 1500 ug/ml, the 100% death percentage was still not obtained. Similarly, the methanol extracts were also non toxic at the dose of 1000 ug/ml. However, *M. cochinchinensis* (6) and *M. tetragonus* (7) were considered to be mild toxic as their methanol extracts were able to kill 100% *A. salina* larvae when the dose was raised to 1500 ug/ml.

Conclusion: The different test result (at 1500 ug/ml) shown by two methanol extracts of similar species *M. tetragonus* {2b (killed 52%) & 7b (100%)} should give an idea that the benalu are practically non toxic and safe to be consumed for tumor treatment.

Key words : toxicity screening, brine shrimp lethality test (bst) - benalu leaves - benalu hosts - anti tumor.

ABSTRAK

Mae Sri Hartati W, Subagus Wahyuono - *Skrining toksisitas dengan menggunakan "Brine Shrimp Lethality Test (BST)" dari daun beberapa species benalu yang secara tradisional digunakan untuk mengobati tumor di Indonesia.*

Latar belakang : Secara tradisional daun beberapa benalu spesies digunakan untuk mengobati tumor di Indonesia. Beberapa penelitian mampu menunjukkan aktivitas ke arah anti tumor, tetapi penelitian toksisitas dengan BST belum pernah dilakukan. Oleh karena itu perlu dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui tingkat ketoksikan dan menentukan apakah daun benalu aman untuk dikonsumsi.

Tujuan penelitian : Untuk menentukan tingkat ketoksikan dari enam spesies daun benalu {*Dendrophloe pentandra* L. Miq. (1), *Macrosolen tetragonus* (Bl.) Miq (2 dan 7), *Helixanthera parasitica* Lour. (3), *Dendrophloe falcata* (Lf.) Ettings (4), *Dendrophloe constricta* Dans. (5), *Macrosolen cochinchinensis* (Lour.) Tiegh. (6)}.

Mae Sri Hartati W^{*}, Subagus Wahyuono^{**}

^{*} Dept. of Pharmaceutical Medicine, Faculty of Medicine &

^{**} Dept. of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy,
Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

Metode : Daun benalu dari tiap spesies di ekstraksi dengan kloroform kemudian dengan metanol. Ekstrak kloroform dan ekstrak metanol kering diuji ketoksikannya dengan menggunakan *Brine Shrimp Lethality test* (BST) pada dosis 1500, 1000 dan 500 ug/ml. Tingkat ketoksikan ekstrak ditentukan dengan melihat persentase kematian larva *A. salina* setelah 24 jam pemberian ekstrak pada dosis di atas. Ekstrak dinyatakan toksik apabila mampu membunuh 100% larva *A. salina* pada dosis < 1000 ug/ml, dan dinyatakan sedikit toksik apabila mampu membunuh 100% larva *A. salina* pada dosis 1500 ug/ml.

Hasil penelitian : Seluruh ekstrak kloroform daun benalu praktis non toksik karena tidak mampu membunuh 100% larva *A. salina*, dan kematian larva 100% masih belum diperoleh walaupun dosis dinaikkan menjadi 1500 ug/ml. Ekstrak metanol daun benalu praktis juga non toksik, tetapi *M. cochinchinensis* (6) dan *M. tetragonus* (7) dinyatakan sedikit toksik karena kedua ekstrak tersebut pada 1500 ug/ml mampu membunuh seluruh (100%) larva *A. salina*. Hasil BST kedua ekstrak metanol (2b dan 7b) dari spesies yang sama (*M. tetragonus*) pada dosis 1500 ug/ml adalah berbeda {2b (membunuh 52%) dan 7b (100%)}.
Simpulan : Daun benalu praktis non toksik dan aman untuk dikonsumsi pada pengobatan tumor.

(B.I.Ked. Vol. 31, No. 1: 17-22, Maret 1999)

PENGANTAR

Secara tradisional, daun benalu telah digunakan untuk mengobati tumor di Indonesia dan beberapa tempat di dunia¹. Beberapa resep obat tradisional berisi daun benalu telah dikenalkan akhir-akhir ini². Penyembuhan tumor oleh daun benalu menjanjikan di masa mendatang sebagaimana ditunjukkan oleh data kesembuhan pada 8,57% pasien dengan tumor ganas dan 13,33% tumor jinak setelah pengobatan dengan daun benalu selama 2 tahun³. Di samping hasil yang menjanjikan, tingkat ketoksikan dari daun benalu belum banyak diteliti secara ilmiah. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan tingkat ketoksikan 6 species daun benalu secara BST (*Brine shrimp lethality test*).

Berbagai uji ketoksikan telah diperkenalkan. Metode uji ketoksikan dengan BST dikenal sebagai metode yang sederhana karena kecepatannya, *reliable*, murah dan mudah serta dapat dikerjakan di rumah. Metode BST telah digunakan untuk berbagai keperluan misalnya menentukan adanya residu bahan beracun⁴, menentukan potensi anaestetika⁵, *bioassay* senyawa bioaktif⁶, dan mencari senyawa berpotensi antikanker dari bahan alami^{7,8}. Beberapa senyawa antikanker telah berhasil diisolasi dari bahan alami yang dilakukan secara ekstraksi & partisi termonitor oleh BST, dua senyawa di antaranya mampu menghambat pertumbuhan sel kanker (in vitro), dan uji klinisnya masih dilakukan. Dua senyawa tersebut diidentifikasi sebagai uvaricin yang diisolasi dari tanaman *Uvarica acuminata*⁹ dan bullatacin yang berhasil diisolasi dari tanaman *Annona bullata*¹⁰. Uvaricin menunjukkan penghambatan pada in vivo PS system (P-388 lymphocytic leukemia pada

mencit); dan bullatacin menghambat kultur sel tumor lebih baik dibandingkan dengan adriamycin yang secara klinis telah digunakan untuk mengobati tumor.

Di samping kesuksesan dalam penggunaan BST untuk mencari senyawa antikanker, Subagus¹¹ dan Nurlaila¹² secara terpisah meneliti adanya hubungan antara hasil BST dengan efek toksisitas pada binatang percobaan. Subagus¹¹ menemukan bahwa daun srikaya (*Annona squamosa*) sangat toksik pada uji BST (LD-50 = 2 ug/ml). Nurlaila¹² menyebutkan bahwa ekstrak air daun *A. squamosa* bersifat embriotoksik pada tikus betina. Sifat ketoksikan daun srikaya mungkin lebih terletak pada perkembangan embrio (blastogenesis) daripada perkembangan organ (organogenesis). Kesimpulan ini diambil 22,97% embrio tikus terlahir mati, sementara efek teratogenisitasnya tidak nampak. Berdasarkan bukti di atas dapat disimpulkan bahwa data toksisitas dari BST mempunyai hubungan dengan sifat ketoksikan pada binatang percobaan. Oleh karena itu data BST mampu secara umum memberi indikasi adanya senyawa toksik dalam suatu bahan alami, dan secara spesifik dapat digunakan untuk memprediksi tingkat ketoksikan dari daun benalu.

BAHAN DAN CARA

Bahan : Daun benalu *Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq., (1), *Macrosolen tetragonus* (Bl.) Miq., (2 & 7), *Helixanthera parasitica* Lour. (3), *Dendrophthoe falcata* (Lf.) Ettings (4), *Dendrophthoe constricta* Dans. (5), *Macrosolen cochinchinensis* (Lour). Thiegh. (6). Tanaman 1 dan 2 tumbuh pada tanaman mangga (*Mangifera*

indica, fam. Anacardiaceae) yang diambil dari desa Karang Bendo, Banguntapan, Bantul, Yogyakarta pada tanggal 26 Agustus 1998. Tanaman 3, 4 & 5 tumbuh di Jambu air (*Syzygium aquetum*, fam. Myrtaceae) yang diambil di lokasi yang sama seperti di atas, sedangkan tanaman 6 & 7 tumbuh pada tanaman srikaya (*Annona Squamosa*, fam. Annonaceae). Tanaman tersebut selanjutnya diidentifikasi di Laboratorium Farmakognosi, bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Telur udang (Premium Extra Brine Shrimp Eggs, HS no. 0511.99.600, Seagull International, The Great Salt Lake, USA), Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*, Lessafre 290703 Marc, France; Chloroform p.a (E Merck), Methanol p.a (E Merck).

Pembuatan sampel I : Masing-masing serbuk daun benalu (25 g) dimaserasi dengan kloroform, kemudian diikuti dengan metanol, sehingga diperoleh ekstrak kloroform (1a-7a) dan ekstrak metanol (1b-7b) dari masing-masing daun benalu. Sampel dibuat dengan melarutkan 100 mg ekstrak (1a,b-7a,b) dalam 2,0 ml campuran kloroform: metanol (2:1 v/v) sebagai larutan awal. Sejumlah tertentu dari larutan tersebut (15, 10 & 5 ml) dimasukkan dalam vial (3 ml) kemudian pelarutnya diuapkan dalam vakum. Untuk uji ini, dibutuhkan kontrol/blanko yaitu kloroform (A) sebagai kontrol ekstrak kloroform dan metanol (B) sebagai kontrol ekstrak metanol.

Penetasan telur udang : Telur udang ditetaskan dalam wadah segiempat (22 x 32 cm) yang terisi dengan air laut buatan yang dibuat menurut prosedur dari Michael⁴. Plastik yang berlubang-lubang kecil (2 mm) diletakkan sebagai pembagi dua bagian tidak sama besar. Telur diletakkan di bagian yang besar & gelap (ditutupi), sedangkan bagian kecil diterangi sinar lampu. Setelah 48 jam, telur menetas menjadi larva (nauplii) yang diambil dari bagian yang terang terpisah dari kulit telur.

Bioassay toksisitas I : Sepuluh anak udang ditransfer ke masing-masing vial dengan menggunakan pipet dan air laut buatan ditambahkan sampai volume 3 ml, sementara itu vial masih tetap disinari. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam dan tingkat ketoksikan ditentukan dengan menghitung jumlah nauplii yang mati (x). Hasil

(x) dibandingkan dengan kontrol (A & B) yang tidak membunuh nauplii. Oleh karena itu tingkat ketoksikan dihitung sebagai $\{x : 10\} \times 100\%$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Host (tempat hidup) benalu dan tempat pengumpulan dicatat karena hal ini berhubungan dengan variasi metabolit yang dihasilkan oleh setiap spesies. Karena metabolit sekunder sangat bervariasi dan tergantung pada lingkungan tempat tumbuh (antara lain tipe tanah tempat tanaman tersebut tumbuh). Dilaporkan bahwa waktu terbaik untuk mengumpulkan bahan adalah pagi hari karena aktivitas metabolisme optimum adalah di pagi hari saat intensitas sinar ultraviolet optimum.

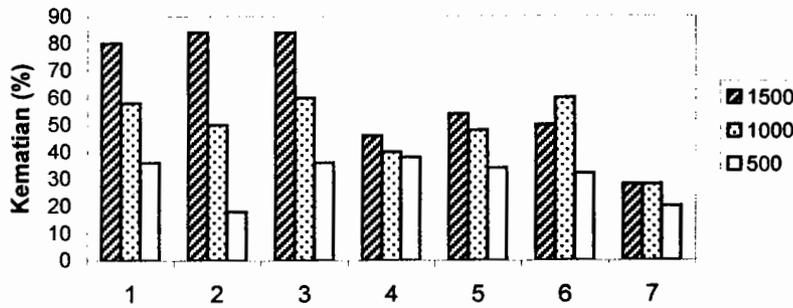
Sebelum penelitian dengan tanaman dimulai, kepastian identitas spesies perlu ditetapkan karena tiap spesies mempunyai karakteristik metabolit sekunder sendiri-sendiri yang berperan dalam proses penyembuhan. Mengesampingkan langkah ini dapat berakibat hilangnya informasi tentang adanya substansi toksik maupun substansi aktif yang ada dalam bahan tanaman.

Setelah dipanen, daun benalu dicuci dengan air suling, dikeringkan dengan oven dan diserbuk dengan mesin penyerbuk. Serbuk daun benalu secara bertahap disari dengan kloroform dan dilanjutkan dengan metanol. Langkah ini penting karena ekstraksi sempurna dan diperoleh lebih baik bila material ada dalam bentuk serbuk. Kloroform yang merupakan pelarut relatif non-polar akan melarutkan semua senyawa toksik yang bersifat non-polar dan semi-polar yang ada di dalam daun benalu, sedangkan metanol yang merupakan pelarut polar akan melarutkan senyawa toksik polar yang terdapat dalam daun benalu. Pemisahan terlebih dahulu dari senyawa-senyawa toksik tersebut dalam golongan polar dan non-polar sangat menguntungkan. Langkah ini dapat digunakan untuk memprediksi lokasi senyawa toksik, sehingga dapat memberi gagasan tentang langkah selanjutnya yang perlu dilakukan.

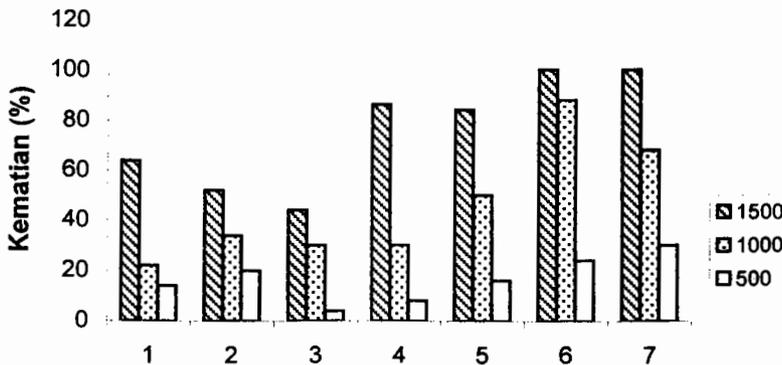
Uji toksisitas dengan BST dilakukan pada dosis 500, 1000 dan 1500 ug/ml karena dosis ini merupakan dosis standar yang dilakukan untuk memprediksi tingkat ketoksikan dengan uji BST. Hasil uji BST dituliskan pada TABEL 1, dan GAMBAR 1 yang menggambarkan hasil uji toksisitas dari ekstrak-ekstrak kloroform (a) spe-

sies benalu (1- 7) pada dosis yang berbeda-beda (1500, 1000 dan 500 ug/ml). GAMBAR 2 menggambarkan hasil-hasil uji toksisitas dari ekstrak-ekstrak metanol (**b**) dari spesies benalu (1-7) juga pada dosis yang berbeda-beda. Hasil uji BST (TABEL 1) menunjukkan bahwa solvent sebagai kontrol (**A**, kloroform; dan **B**, metanol) tidak mempengaruhi hasil uji, tidak ada nauplii yang mati ($x = 0$) $\mu\text{g/ml}$ (TABEL 1) adalah non toksik. Apabila dosis ekstrak-ekstrak kloroform dinaikkan menjadi dua kalilipat (1000 $\mu\text{g/ml}$), jumlah nauplii yang mati bertambah walaupun pertambahan jumlah kematian tidak secara pasti menjadi dua kalilipat. Pertambahan jumlah nauplii yang mati bervariasi, beberapa di antaranya hampir dua

kali lipat [**1a** (36 menjadi 58%); **3a**(36 menjadi 60%); **6a** (32 menjadi 60%), dan hampir tiga kalinya [**2a** (18 menjadi 50%), tetapi beberapa di antaranya terlihat tidak ada pengaruh sama sekali [**7a** (20 menjadi 28%); **4a** (38 menjadi 40%). Variasi ini diperkirakan karena perbedaan kelarutan substansi toksik yang terdapat di dalam daun benalu. Beberapa senyawa lain yang terdapat dalam daun benalu mungkin juga mampu menaikkan atau justru menurunkan kelarutan senyawa toksik dalam medium air. Oleh karena itu keragaman yang terjadi sangatlah memungkinkan. Kematian sempurna nauplii (100%) tidak terjadi pada dosis 1000 $\mu\text{g/ml}$, bahkan tidak terjadi walaupun dosisnya dinaikkan menjadi 1500



GAMBAR 1. - Hasil BST setelah pemberian ekstrak kloroform ($\mu\text{g/ml}$) dari spesies Benalu (1-7)



GAMBAR 2. - Hasil BST setelah pemberian ekstrak metanol ($\mu\text{g/ml}$) dari spesies Benalu (1-7)

TABLE 1. - Hasil BST beberapa spesies benalu

No	Spesies dan inang	Dosis (µg/ml)	Persentase kematian nauplii (%)			
			a	A	b	B
1	<i>Dendrophthoe pentandra</i> (1) Inang: Mangga	1500	80	0	64	0
		1000	58	0	22	0
		500	36	0	14	0
2	<i>Macrosolen tetragonus</i> (2) Inang: Mangga	1500	84	0	52	0
		1000	50	0	34	0
		500	18	0	20	0
3	<i>Helixanthera parasitica</i> (3) Inang: Jambu air	1500	84	0	44	0
		1000	60	0	30	0
		500	36	0	4	0
4	<i>Dendrophthoe falcata</i> (4) Inang: Jambu air	1500	46	0	86	0
		1000	40	0	30	0
		500	38	0	8	0
5	<i>Dendrophthoe constricta</i> (5) Inang: Jambu air	1500	54	0	84	0
		1000	48	0	50	0
		500	34	0	16	0
6	<i>Macrosolen chochinchenensis</i> (6) Inang: Srikaya	1500	50	0	100	0
		1000	60	0	88	0
		500	32	0	24	0
7	<i>Macrosolen tetragonus</i> (7) Inang: Srikaya	1500	28	0	100	0
		1000	28	0	68	0
		500	20	0	30	0

Note: a = ekstrak kloroform, A = kontrol untuk ekstrak kloroform
b = metanol ekstrak, B = kontrol untuk ekstrak metanol

µg/ml. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa ekstrak kloroform dari benalu (1a-7a) praktis tidak toksik.

Sebanding dengan ekstrak kloroform, ekstrak metanol daun benalu (1b-7a) pada dosis 500 µg/ml praktis tidak toksik, dan dalam beberapa hal ekstrak metanol dari benalu yang diteliti kurang toksik dari pada ekstrak kloroform (TABEL 1). Apabila dosis ekstrak metanol dilipatduakan (1000 µg/ml), jumlah kematian nauplii tidak menjadi 2 kalinya juga, dan jumlah kematian yang 100% juga tidak nampak. Oleh karena itu, ekstrak metanol daun benalu praktis juga tidak toksik. Walaupun demikian, suatu hasil yang menarik ditunjukkan oleh metanol ekstrak 6b (*M. cochinchinensis*) dan 7b (*M. tetragonus*). kedua ekstrak mampu membunuh nauplii 100% bila dosisnya dinaikkan menjadi 1500 µg/ml, tetapi ekstrak metanol 2b (*M. tetragonus*) pada dosis 1500 µg/ml hanya mampu membunuh 52% nauplii. Hasil ini memberi gambaran bahwa perbedaan toksisitas dari spesies yang sama ini disebabkan karena pengaruh inang (tempat tumbuh benalu). Daun benalu 2b dikumpulkan dari benalu yang tumbuh di pohon mangga, sedangkan daun benalu 7b dikumpulkan dari benalu yang tumbuh di pohon srikaya (*Annona squamosa*).

Telah disebutkan di depan bahwa daun srikaya bersifat embriotoksik dan sebaliknya tidak ada laporan bahwa tanaman *M. indica* bersifat toksik. *A. squamosa* telah diketahui mengandung senyawa asetogenin yang bersifat sitotoksik pada beberapa kultur sel tumor dan senyawa ini pada dosis yang sangat kecil mampu membunuh 100% nauplii. Oleh karena itu, diasumsikan bahwa kedua benalu ini (6 & 7) mampu mengadsorpsi senyawa asetogenin dari tanaman tempat mereka tumbuh. Bullatacin adalah salah satu dari senyawa asetogenin yang toksik pada uji BST (LC-50 = $1,59 \times 10^{-3}$ M) dan toksik terhadap berbagai kultur sel tumor. Oleh karena itu, tidak disangsikan lagi bahwa daun benalu akan lebih toksik pada uji BST dan pada binatang percobaan apabila benalu tersebut tumbuh pada tanaman *Annona* sp. sebagai inangnya.

Tanpa mengesampingkan pengobatan tumor dengan daun benalu yang kurang efektif; pengobatan tumor dengan benalu adalah menguntungkan karena daun benalu relatif tidak toksik apabila tumbuh pada tanaman yang tidak toksik. Dalam beberapa hal, apabila pengobatan dengan daun benalu ternyata efektif maka dapat diperkirakan bahwa daun benalu berefek seperti sayuran pada umumnya. Daun benalu mungkin mampu

menghambat mutasi genetik dari sel sehat yang akan berkembang menjadi sel-sel kanker; atau mungkin daun benalu mampu menghambat proses-proses yang menyebabkan terjadinya pembelahan sel yang berlebih dari sel-sel genetik yang rusak menjadi sel-sel kanker¹³. Akhir-akhir ini Mae¹⁴ meneliti efek daun benalu (*Dendrophloe* sp) pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan bensidine sebagai karsinogen. Ekstrak air (20%) dari daun benalu dapat menurunkan GPT dan konsentrasi protein total. Selain itu perbaikan sel-sel hepar juga nampak sebagaimana ditunjukkan oleh histogram hepar. Mengingat hasil ini mestinya benalu dapat untuk pengobatan tumor sebagaimana disarankan oleh pengobat-pengobat tradisional, dan daun benalu ini praktis tidak toksik. Penelitian uji toksisitas pada binatang percobaan sangat perlu dilakukan, terutama apabila daun benalu ini akan diaplikasikan dalam pengobatan formal.

SIMPULAN

Daun benalu praktis tidak toksik dan aman dikonsumsi untuk pengobatan tumor, tetapi pengumpulan daun benalu direkomendasikan dari inang yang tidak toksik. Untuk menentukan tingkat ketoksikan dari daun benalu, uji lanjut dengan binatang percobaan perlu dilakukan terutama apabila daun benalu akan digunakan untuk pengobatan formal sebagaimana disarankan oleh Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

REFERENCES

1. Hartwel JL. Plants Used Against Cancer, Quarterman Publications, Inc., Lawrence, Massachusetts, 1982, 356-359
2. Asmino. Resep ramuan obat kanker, Higina 055, 1995, 126-128
3. Sentra P3T-DIY, Pengkajian Pengobatan Penderita Kanker yang Berobat ke BATTRA Ramuan Daun Benalu di Daerah Istimewa Yogyakarta, Hari Kesehatan Nasional ke -34 di DIY, RS Bethesda, 7 November 1998
4. Michael AS, Thompson CG, Abramowitz M. *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay, Science, 1956, 123, 464
5. Robin AB, Ma KF, Anth MP, Catche JF, Paul L. Anesthesia of *Artemia* larvae: Method for Quantitative Study, Science, 1965, 156, 1255-1259
6. Tarpley WA. Studies on the Use of the Brine Shrimp *Artemia salina* (Leach) as a Target Organism for Bioassay, J Econ Entomol, 1958, 51(6), 780-83.
7. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen L. B, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, Planta Medica, 1982, 45, 31-34.
8. Clark AM. Natural Products as a Source for new Drugs, Pharmaceutical Research, 1996, vol. 13, no. 8, 1133-1141
9. Jolad SD, Hoffmann JJ, Schram KH, Cole JR. Uvaricin, a New Antitumor Agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae), J Org Chem, 1982, 47, 3151-3153
10. Gu ZM, Zeng L, Schwendler JT, Wood KV, McLaughlin JL. New Bioactive adjacent Bis-THF annonaceous acetogenins from *Annona Bulata*, Phytochemistry, 1995, 40(2), 467-477
11. Subagus Wahyuono and Abdul Rahman. Uji Toksisitas beberapa tumbuhan obat Indonesia dengan Brine Shrimp Lethality Test (BST), Majalah Farmasi Indonesia, 1995, 6(4), 108-114
12. Nurlaila. Efek Embriotoksik Daun *Annona squamosa* (Srikaya) dan *Annona muricata* (Sirsat) pada Tikus Betina, 1997, Seminar *Annona squamosa* (Srikaya), tanggal 27 September 1997, Fakultas Farmasi, Univ. Gadjah Mada, Yogyakarta
13. Greenwald P. Chemoprevention of cancer, Sci Ameri, 1996, September 1996, 96-99.
14. Mae Sri Hartati W, Yustina AAS. Effect of Benalu (*Dendrophloe* sp.) leaves extract on the male white rat (*Rattus norvegicus*) benzidine induced carcinogenicity, YARSI, 1998, Submitted