

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Buah Cabai Rawit (*Capsicum frutescens*) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)

Andika Widianti ¹, Suhardjono ²

ABSTRAK

Latar belakang: Penggunaan cabai rawit sebagai obat tradisional perlu didukung oleh informasi ilmiah tentang khasiat dan efek samping yang ditimbulkan. Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan potensi toksisitas akut ekstrak etanol buah cabai rawit menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).

Metode: Penelitian eksperimental menggunakan *Post Test Only Control Group Design*. Hewan uji berupa 250 larva *Artemia salina* Leach dibagi dalam 5 kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 10 ekor dengan replikasi 5 kali. Bahan uji ekstrak etanol cabai rawit diberikan lewat media yang berisi larva. Konsentrasi akhir ekstrak untuk masing-masing kelompok adalah 500 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml dan 0 µg/ml sebagai kontrol negatif. Hasil didapatkan berdasarkan jumlah larva yang mati 24 jam setelah pemberian bahan uji. LC 50 ekstrak etanol cabai rawit ditentukan dengan analisis probit menggunakan *SPSS 16.0 for windows*.

Hasil: Rata-rata kematian larva pada konsentrasi 500 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml dan 0 µg/ml berturut-turut adalah 10, 7.4, 4.6, 3.2, dan 0. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak menyebabkan jumlah kematian larva yang semakin tinggi ($y=0,714x-0.918$). Didapatkan harga LC 50 dari ekstrak etanol cabai rawit adalah **93,389µg/ml**.

Simpulan: LC50 <1000 µg/ml menunjukkan ekstrak etanol buah cabai rawit memiliki potensi toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Kata kunci: *Capsicum frutescens*, cabai rawit, *brine shrimp lethality test*, toksisitas akut

¹ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

² Staf Pengajar, Bagian Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang

Acute Toxicity Test Of Etanol Extract of Cayenne (Capsicum frutescens) Against Artemia salina Leach Larvae Using Brine Shrimp Lethality Test (BST) Method

Andika Widianti¹, Suhardjono²

ABSTRACT

Background: *The use of cayenne as a traditional medicine needs to be supported by scientific information about the efficacy and side effect. The objective of this research is to prove the presence of toxicity potency in ethanol extract of cayenne using BST methods.*

Method: *An experimental research use Post Test Only Control Group Design. Total sampel were 250 Brine shrimp (Artemia salina Leach) larvae. Ten larvae used in each 5 groups with 5 times replication. Each group was consecutively given 500, 200, 100, 50,0 µg/ml concentrate of ethanol extract of cayenne, the fifth group was used as control. Data obtained by calculating amount of died larva in 24 hours after treatment. LC50 value was analyzed by probit analysis using SPSS 16.0 for windows.*

Result: *The average mortality of larvae at a concentration of 500, 200, 100, 50, and 0 µg/m consecutively were 10, 7.4, 4.6, 3.2, and 0. The higher the extract concentration led to a growing number of high larval mortality ($y=0,714x-0.918$). LC 50 value of fruit extract of cayenne was **93,389 µg/ml**.*

Conclusion: *LC50 <1000 µg / ml indicates ethanol extract of cayenne pepper fruit own a potential for acute toxicity to larvae of Artemia salina Leach.*

Key words: *Capsicum frutescens, cayenne, brine shrimp lethality test, acute toxicity.*

¹ Undergraduate student, Medical Faculty of Diponegoro University, Semarang

² Lecturer, Department of Pharmacy, Medical Faculty of Diponegoro University, Semarang

PENDAHULUAN

Cabai rawit (*Capsicum frutescens*) merupakan tanaman perdu setahun dengan tinggi 50-100 cm dengan banyak percabangan pada batangnya. Masyarakat biasa memanfaatkan buahnya sebagai sayuran dan obat tradisional.¹ Sebagai obat tradisional, buah *Capsicum frutescens* dikatakan memiliki efek tonik, stimulan kuat untuk jantung dan aliran darah, antirheumatik, antikoagulan, antitrombosis, stomakikum (meningkatkan nafsu makan), *rubefacient* (mengakibatkan inflamasi dan kemerahan pada kulit sehingga sering digunakan sebagai campuran obat gosok), anestetik, antihaemorroidal, dan antiseptik.^{1,2} Efek tersebut sebagian besar disebabkan oleh capsaicin yang terkandung di dalam buah *Capsicum frutescens* (0,1-1,5%).²

Capsaicin dikenal memiliki aktivitas antikanker. Berdasarkan penelitian oleh *The American Association for Cancer Research*, capsaicin diduga dapat membunuh sel kanker prostat dengan menyebabkan terjadinya apoptosis.³ Studi klinik di Jepang dan Cina, menunjukkan bahwa capsaicin dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia secara langsung.⁴ Penelitian lain yang dilakukan di Universitas Nottingham menduga bahwa capsaicin dapat merangsang terjadinya apoptosis pada sel kanker paru pada manusia.⁵

Kandungan capsaicin dalam *Capsicum frutescens* dalam kadar tertentu dapat bersifat toksik dan menimbulkan ancaman kesehatan. Ancaman kesehatan tersebut dapat berupa reaksi inflamasi, gangguan fungsi sel, bahkan sampai kematian sel.

Selain capsaicin, beberapa senyawa yang terkandung dalam buah cabai rawit adalah alkaloid, flavonoid, dan sterol atau terpenoid. Biji cabai rawit mengandung beberapa senyawa golongan alkaloid yaitu solanine,

solamidine, solamargine, solasodine, solasomine, serta mengandung capsacidin yang termasuk golongan steroid saponin.^{1,2,6} Pada kadar tertentu, senyawa tersebut di duga dapat bersifat toksik.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi toksisitas akut ekstrak etanol *Capsicum frutescens* menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST) dengan cara mengukur persentase kematian larva *Artemia salina* Leach setelah pemberian ekstrak dan kemudian ditentukan nilai LC50 dari ekstrak etanol *Capsicum frutescens* tersebut. Metode ini sering digunakan sebagai skrining awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tanaman, karena relatif murah, cepat, dan hasilnya dapat dipercaya, serta merupakan skrining awal obat anti kanker.⁷ Bentuk ekstrak etanol dipilih dengan harapan akan didapatkan kandungan senyawa aktif yang ada dalam *Capsicum frutescens*.

METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada bulan Mei 2010 selama 2 minggu. Penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test-Only Control Group Design* ini menggunakan cara pengambilan sampel *Simple Random Sampling* terhadap larva *Artemia salina* Leach. Sampel penelitian berupa 250 ekor larva. Kriteria inklusi adalah larva berumur 48 jam sebagai hewan uji, sedangkan kriteria eksklusi yaitu larva yang tidak menunjukkan aktivitas pergerakan sebelum perlakuan.

Buah cabai rawit segar yang digunakan dalam penelitian ini diidentifikasi terlebih dahulu di Laboratorium Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang. Buah cabai rawit yang digunakan sebelumnya

ditimbang terlebih dahulu dan didapatkan berat buah cabai rawit sebelum dan sesudah dikeringkan adalah 2000 gram dan 553,8 gram.

Buah cabai rawit dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60-80°C kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak untuk memisahkan bagian yang masih kasar. Setelah itu, ditimbang sebanyak 200 gram dan dibungkus menggunakan kertas saring. Buah cabai rawit yang telah terbungkus kertas saring tersebut dimasukkan dalam alat soxhlet yang labu alas bulatnya telah diisi menggunakan ethanol 70% sebanyak 250-400 ml. Heating mantle set suhu pemanas dinyalakan pada 60-80 ° C, alirkan air pada kondensor dan proses ekstraksi dilakukan sampai hasil ekstraksi jernih (sekitar 9-12 kali putaran pelarut). Setelah proses ekstraksi selesai, hasil ekstrak diambil dan dimasukkan dalam labu evaporator. Pelarut diuapkan menggunakan rotary evaporator sampai tidak keluar lagi pada labu alas bulat tempat sisa penampungan pelarut. Hasil ekstraksi dikeringkan dalam oven sampai didapatkan ekstrak yang kering (konsentrasi 100 %). Kemudian ekstrak buah cabai rawit yang diperoleh juga ditimbang dan didapatkan berat ekstrak cabai rawit murni yaitu 37 gram.

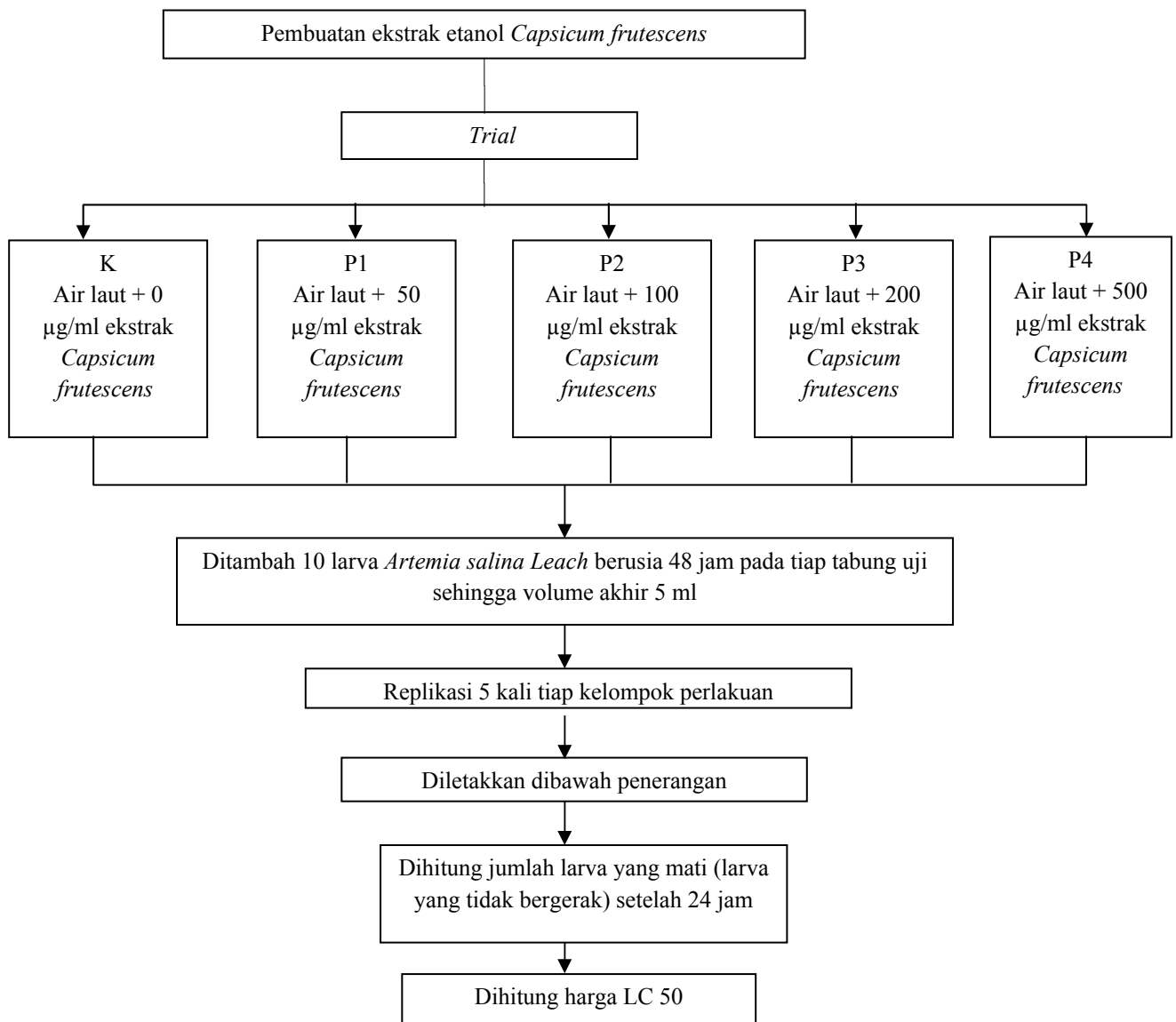
Konsentrasi ekstrak etanol buah cabai rawit yang digunakan pada perlakuan adalah 0,05%, 0,02%, 0,01%, dan 0,005%. Konsentrasi tersebut ditetapkan berdasarkan hasil *trial*.

Larva ditetaskan dengan merendam telur *Artemia salina* dalam aquarium yang berisi air laut dan diberi *aerator*, 24 jam sebelum dilakukan uji. Bagian air laut yang tidak berisi telur diberi penerangan. Hal ini bertujuan agar larva yang sudah menetas bergerak menuju cahaya, sehingga terpisah dari cangkang telurnya.

Pelaksanaan uji dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva berumur 48 jam ke dalam lima *vial* berisi larutan ekstrak etanol buah cabai rawit

dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/ml}$ (P4), 200 $\mu\text{g/ml}$ (P3), 100 $\mu\text{g/ml}$ (P2), 50 $\mu\text{g/ml}$ (P1), dan 0 $\mu\text{g/ml}$ (kontrol negatif). Tiap kelompok perlakuan dilakukan replikasi lima kali. Volume akhir tiap-tiap *vial* sebesar 5 ml. *Vial* kemudian diletakkan dibawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva yang mati. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama 10 detik observasi.

Berikut ini adalah alur penelitian yang dilakukan:



Data primer didapatkan dari jumlah larva yang mati 24 jam setelah perlakuan pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak etanol buah cabe rawit. Setelah melewati proses *editing, coding, entry, dan cleaning*, data konsentrasi ekstrak etanol buah cabai rawit dan jumlah rata-rata kematian larva dianalisa dengan menggunakan analisa probit untuk mengetahui harga LC50 dari ekstrak etanol buah cabai rawit. Kemudian dilakukan uji Regresi Linier untuk mengetahui pengaruh konsentrasi (log konsentrasi) terhadap probit.

Dilakukan uji normalitas Kolmogorov Smirnov untuk mengetahui normalitas sebaran data jumlah rata-rata kematian larva. Kemudian untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan jumlah rata-rata kematian larva dilakukan uji korelasi Pearson (untuk sebaran data normal atau parametrik) dan uji korelasi Spearman (untuk sebaran data tidak normal atau nonparametrik). Data diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik menggunakan program statistik komputer (SPSS 16.0 *for Windows*).

HASIL

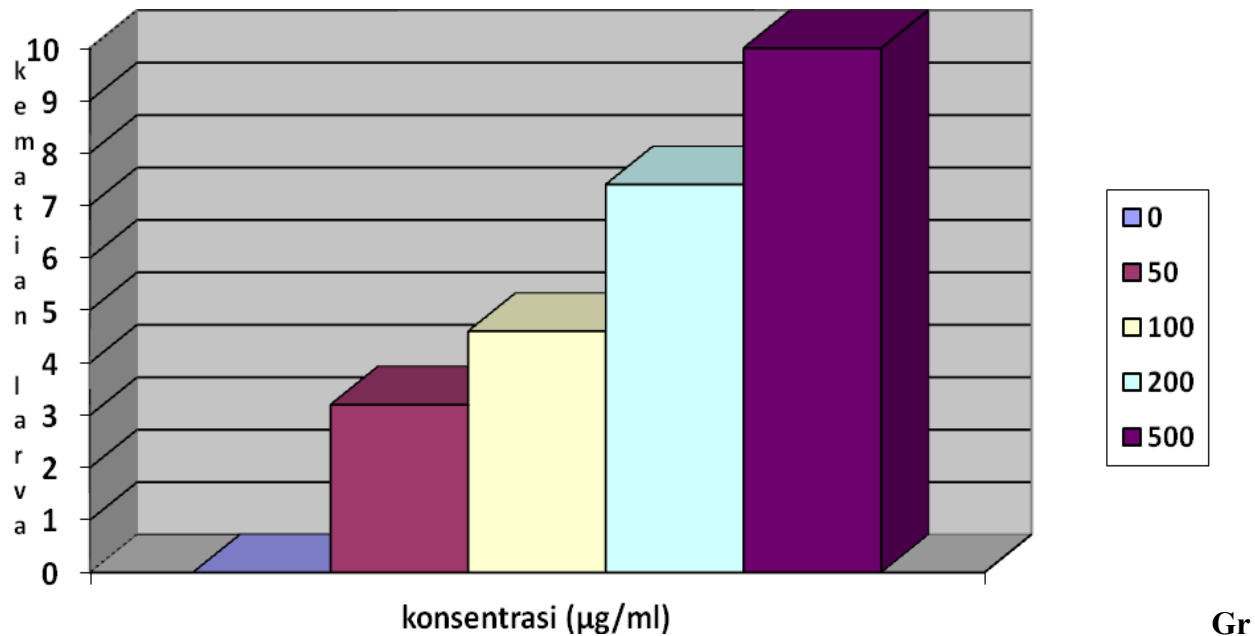
Jumlah larva *Artemia salina* yang mati pada setiap konsentrasi ekstrak etanol buah cabai rawit ditunjukkan dalam tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol cabai rawit (*Capsicum frutescens*) terhadap larva *Artemia salina* Leach.

| Replikasi ke- | Jumlah Kematian Larva Tiap Konsentrasi | | | | Kontrol (-) 0% | Volume Akhir Media |
|--------------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| | 0,05% (500 µg/ml) | 0,02% (200 µg/ml) | 0,01% (100 µg/ml) | 0,005% (50 µg/ml) | | |
| 1 | 10 | 8 | 5 | 2 | 0 | 5 ml |
| 2 | 10 | 6 | 3 | 4 | 0 | 5 ml |
| 3 | 10 | 7 | 5 | 3 | 0 | 5 ml |
| 4 | 10 | 9 | 6 | 2 | 0 | 5 ml |
| 5 | 10 | 7 | 4 | 5 | 0 | 5 ml |
| Total | 50 | 37 | 23 | 16 | 0 | |
| Kematian Rata-Rata | 10 | 7.4 | 4.6 | 3.2 | 0 | |
| Persentase Kematian | 100% | 74% | 46% | 32% | 0% | |

Total kematian diperoleh dengan menjumlahkan larva yang mati pada setiap konsentrasi, sedangkan rata-rata kematian larva diperoleh dengan membagi total kematian larva pada tiap konsentrasi dengan jumlah replikasi yang dilakukan yaitu lima kali. Kemudian dihitung persentase kematian larva dari rata-rata kematian pada tiap konsentrasi.

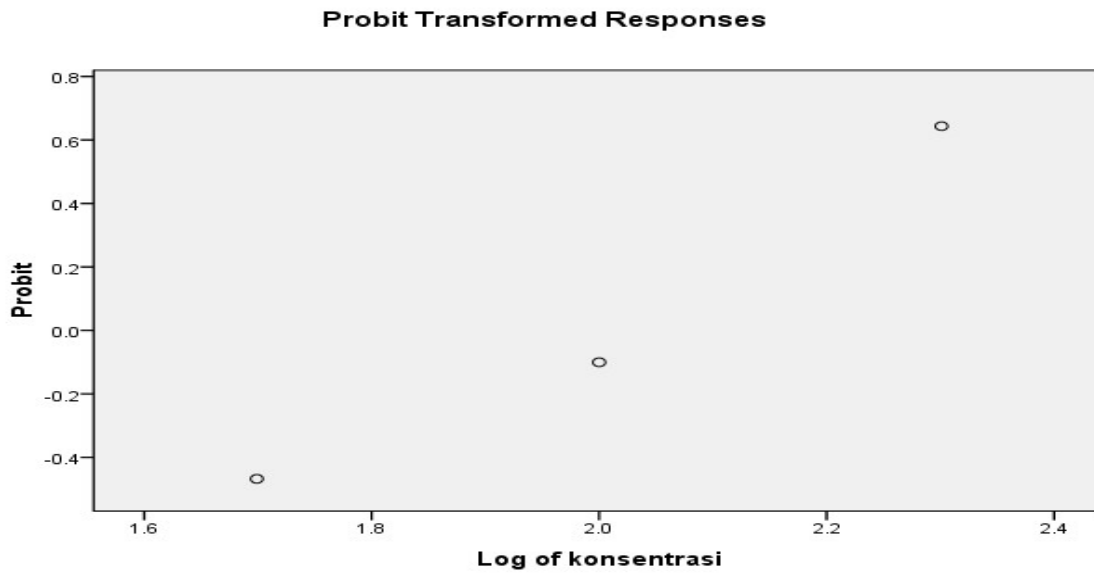
Dari tabel tersebut dapat diketahui bahwa berbagai konsentrasi ekstrak etanol buah cabai rawit pada percobaan ini memperlihatkan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach.



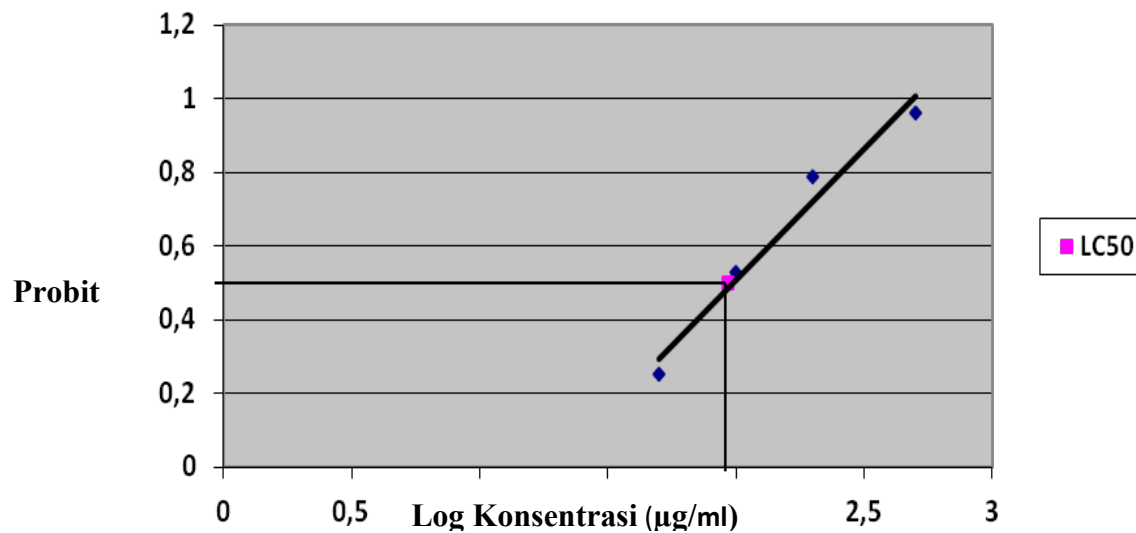
Grafik 1. Pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol cabai rawit terhadap kematian larva *Artemia salina Leach*

Dari grafik diatas dapat dilihat bahwa kenaikan konsentrasi ekstrak etanol buah cabai rawit selalu diikuti dengan kenaikan rata-rata kematian larva *Artemia salina Leach*.

Hasil analisis probit menggunakan *SPSS 16.0 for windows* menunjukkan harga LC 50 ekstrak etanol cabai rawit adalah **93,389** µg/ml. Hasil analisis regresi linear pengaruh log konsentrasi terhadap probit didapatkan persamaan $y = 0.714x - 0.918$ ($R^2 = 0.970$, $p = 0.015$), dimana y adalah *lethal concentration* yang diinginkan dan x adalah log konsentrasi.



Grafik 2. Hubungan log konsentrasi dengan transformasi probit



Grafik 3. Pengaruh log konsentrasi ekstrak etanol buah cabai rawit terhadap probit

PEMBAHASAN

Brine Shrimp Lethality Test (BST) merupakan salah satu metode untuk menguji bahan-bahan yang bersifat sitotoksik. Metode ini menggunakan larva *Artemia salina leach* sebagai hewan coba.⁸

Uji toksisitas dengan metode BST merupakan uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat setelah pemberian dosis uji. Prosedurnya dengan menentukan nilai LC50 dari aktivitas komponen aktif tanaman terhadap larva *Artemia salina leach*. Suatu ekstrak tanaman dikatakan toksik berdasarkan metode BST jika harga LC50 <1000 µg/ml.⁸

Hasil analisis probit didapatkan harga LC50 ekstrak etanol buah cabai rawit adalah sebesar **93.389 µg/ml** (95% *Confidence Interval* = 46.882-147.675). Harga LC50 ini sesuai dengan persamaan yang didapat dari analisis regresi linear, yaitu $LC50 = 0.714 \log \text{ konsentrasi} - 0.918$. Dari hasil analisis regresi linear tersebut juga dapat disimpulkan bahwa peningkatan konsentrasi (log konsentrasi) ekstrak etanol cabai rawit mempengaruhi peningkatan kematian larva artemia (dengan parameter LC50) secara bermakna ($p=0.015$).

Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov terhadap rata-rata kematian larva *Artemia salina Leach* didapatkan sebaran data normal ($p=0.2$). Uji hipotesis dilanjutkan dengan uji korelasi Pearson (uji parametrik) dan didapatkan hasil yang bermakna ($p=0.026$). Hasil uji korelasi menunjukkan ada hubungan yang bermakna antara kenaikan konsentrasi ekstrak etanol buah cabai rawit dengan kenaikan rata-rata kematian larva *Artemia salina Leach*. Merujuk kedua hasil uji statistik yang telah dilakukan, bisa dikatakan bahwa ekstrak etanol buah cabai rawit mempunyai potensi toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina Leach*

. Potensi toksisitas akut ekstrak etanol buah cabai rawit diduga berkaitan dengan kandungan capsaicin yang dimilikinya. Menurut beberapa penelitian, capsaicin dikatakan bersifat sitotoksik. Capsaicin dapat menginduksi kematian sel melalui beberapa mekanisme, diantaranya dengan mengaktivasi VR1; suatu *non-selective cation channel*; sehingga mengakibatkan influks ion berlebih,⁹ menghambat sintesis protein melalui kompetisi dengan tirosin,¹⁰ dan juga mengakibatkan penurunan potensial membran mitokondria yang disertai dengan pembentukan ROS.¹¹ Selain itu, paparan capsaicin menyebabkan terjadinya respon inflamasi, stres oksidatif, dan DNA-*strand breakage*^{12,13} yang dapat mempengaruhi fungsi sel dan pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel. Kematian sel yang terjadi pada larva *Artemia salina leach* pada akhirnya dapat menyebabkan kematian larva itu sendiri.

Senyawa lain dalam cabai rawit yang diduga toksik pada kadar tertentu adalah alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan steroid saponin. Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Senyawa ini juga menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Akibatnya, larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya sehingga larva mati kelaparan.¹⁴

Penelitian Carballo *et al*¹⁵ menunjukkan adanya hubungan yang kuat antara sitotoksitas dan letalitas larva *Artemia salina leach* pada ekstrak tanaman. Apabila harga LC50 suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut metode BST, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat antikanker. Beberapa senyawa antikanker telah berhasil diisolasi dari bahan alami yang dilakukan secara ekstraksi dan partisi termonitor oleh BST, dua senyawa diantaranya mampu menghambat pertumbuhan sel kanker (*in vitro*), dan uji klinisnya masih dilakukan. Dua senyawa tersebut diidentifikasi sebagai uvaricin yang diisolasi dari tanaman *Uvarica acuminata*¹⁶ dan bullatacin yang berhasil diisolasi dari tanaman *Annona bullata*.¹⁷ Uvaricin menunjukkan penghambatan pada *in vivo* sistem P-388 lymphocytic leukemia pada mencit dan bullatacin menghambat kultur sel tumor lebih baik dari adriamycin yang secara klinis telah digunakan untuk

mengobati tumor. Oleh karena itu, buah cabai rawit dapat dilanjutkan penelitiannya sebagai obat antikanker di masa yang akan datang.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol buah cabai rawit pada penelitian ini menunjukkan adanya potensi toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina* Leach yang ditunjukkan dengan harga $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$, yaitu sebesar **93.397 $\mu\text{g/ml}$** ($LC_{50}=0.714\log$ konsentrasi-0.918). Walaupun dikatakan memiliki potensi toksisitas akut, ekstrak etanol buah cabe rawit dikategorikan sebagai *mildly toxic* ($LC_{50} > 30 < 100 \mu\text{g/ml}$) dan mungkin tidak memberikan efek toksik nyata secara langsung pada penggunaan akut.

SARAN

Penelitian ini membuktikan ekstrak etanol buah cabai rawit memiliki potensi toksisitas akut. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan bahan informasi tentang potensi toksisitas akut ekstrak etanol buah cabai rawit sebagai salah satu tanaman herba yang banyak digunakan oleh masyarakat. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang potensi toksisitas akut buah cabai rawit dalam bentuk sediaan lainnya seperti infusa, serta dapat dilanjutkan penelitiannya sebagai obat anti kanker di masa yang akan datang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Drs.Suhardjono, Apt, Msi; Dra. Murnah, Apt; dr. Noor Wijayahadi, M.Kes, Ph.D serta staf bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cabai rawit. [Online]. 2008 Nov 11 [cited 2009 Des 4]; Available from: URL: http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?mnu=2&id=213.
2. *Capsicum frutescens* L. [Online]. 2008 [cited 2009 Nov 6]; Available from: URL: <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Capsicum+frutescens>.
3. Mori A, Lehmann S, O'Kelly J et al. Capsaisin, a component of red peppers inhibits the growth of androgen-independent p53 mutant prostate cancer cells. [Online]. Cancer Research (Americans Association for Cancer Research) 2006; 66(6): 3222-3229. Available from: URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/66/6/3222>. [cited 2009 Nov 6].
4. Ito K, Nakazato T, Yamato K et al. Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress; implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. [Online]. Cancer Research (Americans Association for Cancer Research) 2004; 64(3): 1071-1078. Available from: URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/full/64/4/1071>. [cited 2009 Nov 6].
5. How spicy foods can kill cancers. [Online]. 2007 [cited 2009 Nov 6]; Available from: URL: <http://news.bbc.co.uk/go/pr/fr/-/2/hi/health/6244715.stm>.
6. *Capsicum frutescens* L. [Online]. 2008 [cited 2009 Nov 6]; Available from: URL: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/pdf/shrubs/capsicum%20frutescens.pdf>.

7. Sam TW. 1993. Toxicity testing using brine shrimp: *Artemia salina*. Dalam: Colegate SM and Molyneux RJ (Eds.), *Bioactive Natural Product Detection, Isolation, and Structural Determination*. CRC Press, Boca Raton, FL: 442-456.
8. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobson LB, Nichols DE and McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituent. *Planta Medica*, 45: 31-34.
9. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-824.
10. Cochereau C, Sanchez D, Creppy EE. 1997. Tyrosine prevent capsaicin-induced protein synthesis inhibition in cultured cells. *Toxicology*, 117(2-3): 133-139.
11. Gallati G, O'Brien PJ. 2003. Cytoprotective and anticancer properties of coenzyme Q versus capsaicin. *Biofactors*, 18(1-4): 195-205.
12. Richeux F, Cascante M, Ennamany R, Saboureau D, Sanni A, Creppy EE. 2006. Implication of oxidative stress and inflammatory process in the cytotoxicity of capsaicin in human endothelial cells: lack of DNA strand breakage. *Toxicology*, 147(1): 41-49.
13. Richeux F, Cascante M, Ennamany R, Saboureau D, Creppy EE. 1999. Cytotoxicity and genotoxicity of capsaicin in human neuroblastoma cell SHSY-5Y. *Arc of Toxicology*, 73(7): 403-409.

14. De Padua LSN, Bunyapraphatsana RH, Lemmens MJ (eds.). Medicinal and Poisonous Plant Research of South-East Asia 12. Pudoc Scientific Publisher. Wageningen, the Netherland;1999. p.353-359.
15. Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravaloz MD. Comparison between two brine shrimp assay to detect in vitro cytotoxicity in marine natural product. BMC Biotechnology. [Online]. 2002 Sept 23 [cited 2009 Sept 25]; [13 screen]. Available from: URL: <http://www.biomedcentral.com/1472-6570/2/17>.
16. Jolad SD, Hoffman JJ, Schram KH, Cole JR. Uvaricin, a New Antitumor Agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae), J Org Chem, 1982, 47, 3511-3513.
17. Gu ZM, Zeng L, Schwendler JT, Wood KV, McLaughlin JL. New Bioactive Adjacent Bis-THF annonaceous acetogenin from *Annona bullata*, Phytochemistry, 1995, 40(2), 467-477.