

**UJI TOKSISITAS AKUT EKSTRAK ETANOL DAUN
KAMBOJA (*Plumeria alba L.*) TERHADAP LARVA *Artemia
salina Leach* DENGAN METODE BRINE SHRIMP
LETHALITY TEST (BST)**

ACUTE TOXICITY TEST OF ETANOL EXTRACT OF *Plumeria alba L.*
AGAINST *Artemia salina Leach* LARVAE USING BRINE SHRIMP
LETHALITY TEST (BST) METHOD

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan
guna mencapai derajat sarjana strata-1 kedokteran umum**

**ERCILA RIZKY ROLLIANA
G2A 006 058**

**PROGRAM PENDIDIKAN SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2010**

Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria alba* Linn) Terhadap Larva *Artemia salina* Leach Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST)

Ercila Rizky Rolliana¹, Suhardjono²
ABSTRAK

Latar belakang: Kamboja sudah dikenal masyarakat Indonesia sejak lama dan digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit. Pemakaian dalam jumlah tertentu dapat menyebabkan toksisitas, maka perlu dilakukan skrining awal kesesuaian hanya jika akut nilai toksisitasnya. Tujuan penelitian kali ini ialah untuk membuktikan ada tidaknya potensi toksisitas akut pada ekstrak etanol daun kamboja menurut metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BST).

Metode: Digunakan 250 ekor larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Sebagai bahan uji adalah ekstrak etanol daun kamboja. Hasil pengamatan adalah terhadap larva yang mati 24 jam setelah pemberian bahan uji. Berdasarkan data, LC 50 ekstrak etanol daun kamboja 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, 7.2, 3,6, 1.2, dan 0. Hasil dari analisis probit menunjukkan harga LC 50 dari ekstrak etanol daun kamboja adalah **132,340 µg/ml**, sedangkan dari hasil analisis regresi didapatkan LC 50 = 0.9388 log konsentrasi-1.5124.

Kesimpulan: Pemberian ekstrak daun kamboja pada penelitian ini, menunjukkan potensi toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina* Leach menurut metode BST. Hal ini ditunjukkan dengan harga LC 50 <1000 µg/ml.

Kata kunci: *Plumeria alba* Linn., *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 Ethanol Extract of Frangipani Leaf (Plumeria alba Linn) Against Larvae of Artemia salina Leach Using Brine Shrimp Lethality Test (BST)

ABSTRACT

Background: Cambodia has long been known to the Indonesian community and used as traditional medicine to treat various diseases. The usage in current amount could cause toxicity, so it is necessary to do a first screening appropriately if only the toxicity value is acute. The aims of this research is to prove the presence of toxicity potency in ethanol extract of frangipani leaf using BST methods.

Method: Used 250 larvae *Artemia salina* Leach as test animals. As test materials are frangipani leaves ethanol extract. The observation is on the larvae that died 24 hours after administration of test materials. Based on the data, the LC 50 of ethanol extract of leaves of *Plumeria alba* determined by probit analysis using SPSS 16.0 for windows.

Result: Mean larvae death in the concentration of 500, 200, 100, 50, and 0 µg/m consecutively were 10, 7.2, 3.6, 1.2, and 0. The result of probit analysis indicated that LC 50 value extract of frangipani leaf was **132.340 µg/ml**, whereas the regression analysis results obtained from the $LC\ 50 = 0.9388\log\ concentration - 1.5124$

Conclusion: The administering of ethanol extract of frangipani leaf, in this research, had acute toxicity potential against *Artemia salina* Leach larvae according to BST method. It is indicated by LC 50 value <1000 µg/ml.

Key words: *Plumeria alba* Linn., brine shrimp lethality test, acute toxicity.

PENDAHULUAN

Kanker menjadi masalah utama kesehatan di seluruh dunia dan penyakit pembunuh terbesar kedua setelah kardiovaskuler.¹ Pengobatan konvensional yang umum dilakukan pada penyakit kanker antaranya dengan pembedahan, kemoterapi dan radioterapi.² Namun, terapi kanker secara pembedahan tidak dapat dilakukan khususnya pada sel kanker yang telah menyebar (metastasis), sementara pengobatan kemoterapi dan radiasi dapat menimbulkan efek samping meskipun pengobatan kemoterapi mampu mengeluarkan keseluruhan tumor.³

Menurut penelitian masa kini, obat-obatan tradisional memang bermanfaat bagi kesehatan, dan kini digencarkan penggunaannya karena lebih mudah dijangkau masyarakat, baik harga maupun ketersediaannya. Obat tradisional pada saat ini banyak digunakan karena menurut beberapa penelitian tidak terlalu menyebabkan efek samping, karena masih bisa dicerna oleh tubuh.⁴

Salah satu tanaman yang telah banyak dikenal dan digunakan secara luas oleh masyarakat Indonesia adalah kamboja (*Plumeria alba*). Daun kamboja mudah sekali ditemukan dan didapatkan hampir di seluruh Indonesia. Masyarakat Indonesia telah lama dipercaya dan digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit, tapi belum banyak diteliti.⁵ Daun kamboja (*Plumeria alba Linn*), mengandung senyawa flavonoid, terpenoid, glycoside dan alkaloid.⁶ Berdasarkan atas informasi tersebut di atas dan untuk menunjang serta melengkapi informasi yang bermanfaat mengenai tanaman obat kamboja ini, maka dilakukan penelitian yang berhubungan dengan tanaman kamboja ini.

Dalam penelitian ini dilakukan proses ekstraksi dari daun kamboja. Setelah itu dilakukan pengujian terhadap toksisitas terhadap daun kamboja dengan menggunakan metode BST (*brine shrimp lethality test*), untuk mengetahui tingkat aktivitas toksisitasnya. Uji toksisitas ini akan dilakukan pada larva *Artemia salina Leach* (brine shrimp) dan merupakan skrining awal obat anti kanker.^{7,8}

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test-Only Control Group Design* dan cara pengambilan sampel yaitu *Simple*

Random Sampling terhadap larva *Artemia salina Leach*, karena anggota populasi telah bersifat homogen, artinya sampel larva *Artemia salina Leach* dengan jenis serta cara penyediaan yang sama, sehingga mempunyai kesempatan yang sama untuk diseleksi sebagai sampel. Sampel penelitian berupa 250 ekor larva *Artemia salina Leach*. Kriteria inklusi adalah larva berumur 48 jam, sedangkan kriteria eksklusi yaitu larva *Artemia salina Leach* yang tidak menunjukkan aktivitas pergerakan sebelum perlakuan.

Bahan yang digunakan adalah ekstrak daun kamboja. Daun kamboja yang digunakan sebelumnya ditimbang terlebih dahulu dan didapatkan berat daun kamboja sebelum adalah 2500 gram dan sesudah dikeringkan adalah 206 gram.

Daun kamboja dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60-80°C sampai kering. Setelah kering, daun kamboja dihaluskan menggunakan blender dan diayak untuk memisahkan bagian yang masih kasar. Setelah itu, ditimbang sebanyak 200 gram dan dibungkus menggunakan kertas saring. Daun kamboja yang telah terbungkus kertas saring tersebut dimasukkan dalam alat soxhlet yang labu alas bulatnya telah diisi menggunakan etanol 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 daun kamboja yang diperoleh juga ditimbang dan didapatkan berat ekstrak daun kamboja murni yaitu 22 gram.

Untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak yang efektif membunuh larva *Artemia salina Leach*, maka dilakukan *trial* atau orientasi dengan uji coba dengan menggunakan konsentrasi desimal, yaitu 1%;0,5%;0,2%;,0,1% dan 0,05%. Setelah dilakukan *trial* atau uji orientasi, akan didapatkan konsentrasi terkecil yang dapat menyebabkan kematian pada semua larva adalah 0,05%. Berdasarkan hasil uji orientasi tersebut, dapat ditetapkan konsentrasi yang akan digunakan pada perlakuan (*definitive test*) adalah 0,05%,0,02%,0,01%,0,005% .

Larva *Artemia salina* Leach ditetaskan dengan merendam telur tersebut dalam air laut, yang dilakukan 48 jam sebelum dilakukan uji di dalam akuarium dan diberi aerator atau pengatur udara. Bagian dari air laut yang tidak berisi telur larva diberi penerangan. Hal ini bertujuan agar larva yang sudah menetas bergerak menuju cahaya, sehingga terpisah dari cangkang telurnya.

Pelaksanaan uji dilakukan dengan mula-mula menyamakan volume akhir ekstrak etanol daun kamboja dengan perbandingan konsentrasi perlakuan 1:2:4:8 yang diencerkan dengan menambahkan air laut terlebih dahulu ke dalam masing-masing tabung uji sampai ekstrak etanol daun kamboja larut, kemudian baru dimasukkan larva udang yang telah berumur 48 jam ke dalam seri tabung uji yang berisi ekstrak etanol daun kamboja yang telah disiapkan masing-masing sebanyak 10 ekor dan ditambahkan 1 tetes ragi (3 mg dalam 5 ml air laut buatan) sebagai makanan larva artemia sehingga volume dalam masing-masing tabung menjadi 5 ml. Tabung uji lalu diletakkan di bawah penerangan selama 24 jam, kemudian dihitung jumlah larva udang yang mati. Kriteria standar untuk menilai kematian larva udang adalah bila larva udang tidak menunjukkan pergerakan selama beberapa 10 detik observasi.

Alur Penelitian

Pembuatan ekstrak etanol *Plumeria alba Linn*

Trial

K

Air laut + 0 µg/ml ekstrak *Plumeria alba Linn*

P1

Air laut + 50 µg/ml ekstrak *Plumeria alba Linn*

P3

Air laut + 200 µg/ml ekstrak *Plumeria alba Linn*

P2

Air laut + 100 µg/ml ekstrak *Plumeria alba Linn*

Diletakkan dibawah penerangan

Dihitung jumlah larva yang mati (larva yang tidak bergerak) setelah 24 jam

Ditambah 10 larva *Artemia salina Leach* berusia 48 jam pada tiap tabung uji sehingga volume akhir 5 ml

Replikasi 5 kali tiap kelompok perlakuan

Dihitung harga LC 50

P4

Air laut + 500 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak *Plumeria alba* Linn

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini menunjukkan beban konsentrasi ekstrak dalam media dapat membunuh larva *Artemia salina Leach* secara berturut-turut dengan konsentrasi 500 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, dan 50 µg/ml. Jumlah kematian larva *Artemia salina Leach* pada setiap tabung uji dalam berbagai konsentrasi perlakuan ekstrak daun kamboja ditunjukkan pada tabel 1. Dari tabel tersebut dapat diketahui bahwa berbagai konsentrasi ekstrak daun kamboja pada percobaan ini memperlihatkan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva *Artemia salina Leach*. Hasil penelitian seperti yang disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria alba Linn*) terhadap larva *Artemia salina Leach*.

Replikasi ke-	Jumlah Kematian Larva Tiap Konsentrasi				Kontrol (-)	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	7	4	0	0	5 ml
2	10	5	3	2	0	5 ml
3	10	6	2	1	0	5 ml
4	10	10	3	1	0	5 ml
5	10	8	6	2	0	5 ml

Total	50	36	18	6	0
Kematia n					
Rata- Rata	10	7.2	3.6	1,2	0
Persentas e	100%	72%	36%	12%	0%
Kematia n					

Jumlah larva *Artemia salina* Leach tiap tabung uji dengan lima kali replikasi adalah 50 ekor. Jumlah total larva *Artemia salina* Leach yang digunakan adalah 250 ekor larva. 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.



Grafik 1. Pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kamboja terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach

Hasil dari analisis probit dengan menggunakan *SPSS 16.0 for windows* menunjukkan harga LC 50 dari ekstrak daun kamboja adalah **132.340** µg/ml.

$$y = 0.9388x - 1.5124$$

$$R^2 = 0.9785$$



Grafik 2. Hubungan log konsentrasi dengan Probit

PEMBAHASAN

Brine Shrimp Lethality Test (BST) adalah suatu metode skrining untuk menentukan toksisitas suatu senyawa atau ekstrak bahan-bahan alami yang bersifat sitotoksik secara akut dengan menggunakan hewan coba larva *Artemia salina* Leach. Apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut harga LC 50 dengan metode BST, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat anti kanker. Namun, bila tidak bersifat toksik maka tanaman tersebut dapat diteliti kembali untuk mengetahui khasiat lainnya dengan menggunakan hewan coba lain yang lebih besar dari larva *Artemia salina* Leach seperti mencit dan tikus secara in vivo.^{7,8}

Suatu ekstrak dinyatakan mempunyai potensi toksisitas akut jika mempunyai harga LC 50 kurang dari 1000 µg/ml.⁸ LC 50 (*Lethal Concentration* 50) merupakan konsentrasi zat yang menyebabkan terjadinya kematian pada 50 % hewan percobaan yaitu larva *Artemia salina* Leach.

Dari hasil analisis probit didapatkan harga LC50 ekstrak etanol daun kamboja adalah sebesar **132.340 µg/ml** (95% *Confidence Interval* =91.717-197.926). Dari hasil analisis regresi linear dapat disimpulkan bahwa $LC50 = 0.939 \log \text{ konsentrasi} - 1,512$, selain itu didapatkan pula bahwa peningkatan konsentrasi (log konsentrasi) ekstrak etanol daun kamboja mempengaruhi peningkatan kematian larva artemia (dengan parameter LC50) secara bermakna ($p=0.013$).

Dari hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov terhadap rata-rata kematian larva *Artemia salina* Leach didapatkan nilai signifikansi atau nilai probabilitas ≥ 0.05 yaitu 0.2 yang berarti sebaran data normal. Uji hipotesis dilanjutkan dengan uji korelasi Pearson (uji parametrik) dan didapatkan hasil $-1 \leq r \leq 1$, yaitu $r=0.942$. Dari hasil uji korelasi, dapat dinyatakan bahwa derajat keterkaitan antara kenaikan konsentrasi ekstrak etanol daun kamboja dengan kenaikan rata-rata kematian larva *Artemia salina* Leach. Dari kedua hasil uji statistik yang dilakukan, dapat

dikatakan bahwa ekstrak etanol daun kamboja mempunyai potensi toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina* Leach.

Pada penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak daun kamboja mempunyai potensi toksisitas akut. Hal tersebut berkaitan dengan senyawa yang terdapat dalam daun kamboja yaitu flavonoid, dimana pada kadar tertentu memiliki potensi toksisitas akut serta dapat menyebabkan kematian larva *Artemia salina* Leach. Mekanisme flavonoid sebagai antikanker ada beberapa teori. Pertama, flavonoid sebagai antioksidan yaitu melalui mekanisme pengaktifan jalur apoptosis sel kanker.^{10,11,12} Mekanisme apoptosis sel pada teori ini akibat fragmentasi DNA. Fragmentasi ini diawali dengan dilepasnya rantai proksimal DNA oleh senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil.^{11,12} Kedua, flavonoid sebagai antioksidan.^{9,13,14} Ketiga, flavonoid sebagai penghambat proliferasi tumor/kanker yang salah satunya dengan menghibisi aktivitas protein kinase sehingga menghambat jalur transduksi sinyal dari membran ke sel inti. Keempat, dengan menghambat aktivitas reseptor tirosin kinase. Karena aktivitas reseptor tirosin kinase yang meningkat berperan dalam pertumbuhan keganasan. Kelima, flavonoid berfungsi juga untuk mengurangi resistensi tumor terhadap agen kemoterapi.¹⁵

Selain flavonoid, beberapa senyawa yang terkandung dalam daun kamboja. Senyawa-senyawa tersebut antara lain adalah alkaloid, terpenoid, dan glikosid. Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai stomach poisoning atau racun perut. Oleh karena itu, bila senyawa-senyawa ini masuk ke dalam tubuh larva, alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa ini menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak mampu mengenali makanannya. Akibatnya, larva mati kelaparan.^{16,17}

Sesuai penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa apabila suatu ekstrak tanaman bersifat toksik menurut harga LC 50 dengan metode BST, maka tanaman tersebut dapat dikembangkan sebagai obat anti kanker^{7,8}, maka daun kamboja dapat dilanjutkan penelitiannya sebagai obat anti kanker di masa yang akan datang.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak daun kamboja pada penelitian ini menunjukkan harga LC 50 adalah **132.340 µg/ml** yang didapat dari hasil analisa probit, sedangkan dari hasil analisa regresi didapat $LC\ 50 = 0.9388 \log \text{ konsentrasi} - 1.5124$, sehingga dapat disimpulkan ekstrak daun kamboja mempunyai potensi toksisitas akut terhadap larva *Artemia salina* Leach yang ditunjukkan dengan harga LC 50 < 1000 µg/ml menurut metode BST.

Menurut tanzania journal of health research potensi toksisitas ekstrak daun kamboja yang mempunyai harga LC 50 lebih dari 100 µg/ml diinterpretasikan sebagai **practically non toxic**.

SARAN

Pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa ekstrak daun kamboja memiliki potensi toksisitas akut. Oleh karena itu, hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan bahan informasi tentang potensi toksisitas akut pada ekstrak daun kamboja sebagai salah satu tanaman herba yang telah dikenal dan digunakan secara luas oleh masyarakat. Berdasarkan hasil penelitian ini pula, diperlukan penelitian lebih lanjut tentang potensi toksisitas akut daun kamboja, serta dapat dilanjutkan penelitiannya sebagai obat anti kanker di masa yang akan datang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Drs.Suhardjono, Apt, Msi; serta staf bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini; serta kedua orang tua yang senantiasa mendukung kami; teman-teman saya Andika Widianti, Dita Mutia yang telah membantu dalam pembuatan laporan ini. Akhir kata saya ucapkan terima kasih kepada rekan-rekan yang sudah ikut berpartisipasi selama pembuatan laporan ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Apantaku LM. Breast-conserving surgery for breast cancer. *Fam. Physician*66; 2002.
2. Hawariah ALP. *Kanker payudara*. Serdang: Penerbit Universiti Putra Malaysia; 1998.
3. Hawariah ALP. *Memahami kanker*. Serdang: Penerbit Universiti Putra Malaysia; 1998.
4. Obat tradisional [online]. 2009 May [cited 2009 Jan 5]. Available from : <http://obat-tradisional.com/2009/5/definisi-obat-tradisional.html>
5. Tumbuhan Antikanker Tersebar di hutan Aceh [online]. 2009 [cited 2009 Nov 3]. Available from: <http://www.serambinews.com>
6. Syamsuhidayat SS, Hutapea JR. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I)*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 1991; p. 452-453.
7. Meyer BNNR, Ferrigni ML. Brine Shrimp, a convenient general bioassay for active plant constituents. *J of Plant Medical Research.*, 1982; p. 45:31-34.
8. Carballo JL, Hernandez-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravaloz MD. Comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2002; p. 1472-6570.
9. Flavonoid [online]. 2007 Sept [cited 2009 Dec 4]. Available from: en.wikipedia.org/wiki/flavonoid.
10. Ogata S, Miyake Y, Yamamoto K, Okumura K, Taguchi H. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (citrus limon BURM. F.) and its metabolites in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol* [serial online] 2000 May [cited 2009 Nov 21]; 64 (5):1075-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm>
11. Vizcaino F et al. The flavonoid quercetin-induced apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research communications* [serial online] 2006 June [cited 2009 Nov 21]; 346 (3):919-25. Available from: <http://www.sciencedirect.com>
12. Ren W. et al. Tartary Buckwheat Flavonoid Activates caspase 3 And Induces HL-60 Cell apoptosis. *Clin Pharmacol* [serial online] 2001 [cited 2009 Nov 21]; 23(8):427. Available from: <http://journals.prous.com>

13. Buhler, Miranda C. Antioxidant activities of Flavonoids [online]. 2000 Nov [cited 2009 Oct 27]. Available from: <http://lpi.oregonstate.edu/food/flavonoid.html>
14. Laino C. Tea May Fight Ovarian, breast cancers [online]. 2006 [cited 2009 Oct 27]. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/529190>
15. Demeule M et al. Green tea catechin as novel antitumor and antiangiogenic compounds. *Curr. Med. Chem-Anti-Cancer Agent*, 2002; p. 2:441-63
16. Rita WS, Suirta IW, Sabikin A. Isolasi&Identifikasi Senyawa Yang Berpotensi Sebagai Antitumor Pada Daging Buah Pare (*Momordica charantia* L.). Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. *Jurnal Kimia* Vol.2. 2008; ISSN 1907-9850.
17. Nguyen HH, Widodo S. *Momordica* L. In: *Medicinal and Poisonous Plant Research of South-East Asia* 12. De Padua L. S. N. Bunyaphatsana and R. H. M. J. Lemmens (eds.). Pudoc Scientific Publisher. Wageningen, the Netherland;1999. p.353-359.