

**UJI AKTIVITAS PENDAHULUAN SEBAGAI ANTIKANKER SENYAWA NON FENOLIK
EKSTRAK *n*-HEKSANA TUMBUHAN PAKU *Christella arida***

**PRELIMINARY TEST AS ANTICANCER OF NON PHENOLIC COMPOUND *n*-
HEXANE EXTRACT OF THE *Christella arida* FERN**

Farah Permata* dan Suyatno

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural sciences
State University of Surabaya

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, email: farah_permata@ymail.com

Abstrak. Tumbuhan paku *Christella arida* merupakan salah satu tumbuhan paku famili *Thelypteridaceae* yang telah dikenal dan dimanfaatkan sebagai tanaman hias. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan struktur molekul senyawa non fenolik dari ekstrak *n*-heksana dan menguji aktivitas pendahuluannya sebagai antikanker. Dalam penelitian ini, ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, fraksinasi senyawa dari ekstrak *n*-heksana menggunakan metode kromatografi (kromatografi cair vakum dan kromatografi lapis tipis), dan pemurnian dengan metode rekristalisasi. Reagen Liebermann-Burchard digunakan sebagai uji kualitatif, penentuan struktur molekul isolat dengan metode spektroskopi (UV-Vis, IR, dan GC-MS), dan metode BSLT digunakan untuk uji pendahuluan aktivitas antikanker. Fraksinasi dari ekstrak *n*-heksana dengan kromatografi kolom menghasilkan serbuk tak berwarna seberat 0,135 gram dengan titik leleh 127-128 °C. Hasil uji fitokimia dari isolat dengan reagen Liebermann-Burchard menunjukkan warna biru kehijauan yang mengindikasikan bahwa isolat positif mengandung senyawa steroid. Berdasarkan analisis spektroskopi, mengindikasikan bahwa isolat merupakan campuran yang mengandung 3 senyawa steroid, terdiri dari kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol. Berdasarkan hasil BSLT menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana tumbuhan paku *Christella arida* dan isolatnya memiliki potensi sebagai antikanker dengan nilai LC_{50} ekstrak *n*-heksana sebesar 22,62 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai LC_{50} isolat sebesar 22,539 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: *Christella arida*, kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol, ekstrak *n*-heksana.

Abstract. *Christella arida* fern is one of fern plant in *Thelypteridaceae*'s family which is already known and used as an exotic plant. The goal of this research is to determine the molecular structure of non phenolic compound from *n*-hexane extract and preliminary test as anticancer. In this case, extraction was done using maseration method, fractionation of the compounds from *n*-hexane extract were conducted by chromatography (vacuum liquid chromatography) monitored by thin layer chromatography), and purification was subjected by recrystallization method. The qualitative test of isolate was used Liebermann-Burchard reagent, for determining the molecular structure of isolate by several spectroscopic methods (such as UV-Vis, IR, and GC-MS), and BSLT method was used for preliminary test of anticancer activity. Isolation of this extract with column chromatography was obtained as colourless powder isolates with 0.135 gram in weight with melting point of 127-128 °C. The results of phytochemical test of isolate with Liebermann-Burchard reagent showed greenish-blue colour indicating that isolate positively contained steroid compound. According to spectroscopic analysis, indicate that the isolate is a mixture containing 3 steroid compounds namely kampesterol, stigmasterol and β -sitosterol. Based on BSLT method showed that the *n*-hexane extract of *Christella arida* and its isolate had value of LC_{50} 22.62 $\mu\text{g/mL}$ and 22.539 $\mu\text{g/mL}$ respectively. In the other hand, this data it can be considered passing a potency as anticancer.

Keyword: *Christella arida*, kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol, *n*-hexane extract.

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit akibat pertumbuhan yang tidak normal dari sel-sel jaringan. Sel-sel tersebut akan menyebar ke seluruh tubuh, sehingga dapat menyebabkan kematian. Penyakit kanker

merupakan salah satu ancaman utama ke dua setelah penyakit kardiovaskuler di negara maju.

Kematian akibat kanker diperkirakan akan meningkat setiap tahunnya dan diprediksi pada tahun 2030 sebanyak 12 juta penduduk di dunia akan mengalami kematian akibat kanker [1].

Berbagai cara pengobatan telah dilakukan untuk mengobati penyakit kanker, seperti kemoterapi, radioterapi, dan pembedahan.

Namun, hingga kini belum ditemukan obat yang dapat mengatasi penyakit tersebut secara memuaskan, karena berbagai pengobatan tersebut banyak memiliki kelemahan seperti harganya yang mahal, rendahnya selektifitas obat-obatan antikanker yang digunakan, dan efek samping yang ditimbulkan. Teknik pengobatan kemoterapi di samping membunuh sel-sel kanker juga dapat mengakibatkan rusaknya sel-sel normal yang menyerap obat tersebut. Banyaknya kendala dan efek samping yang ditimbulkan oleh berbagai pengobatan kanker memicu perlunya suatu terobosan tindakan pencegahan sekaligus pengobatan kanker dengan biaya yang rendah, efektifitas tinggi, dan efek samping minimal.

Salah satu upaya mengatasi penyakit kanker ini adalah mengembangkan pembuatan obat yang berasal dari bahan alam (natural product) yang mengandung senyawa antikanker. Senyawa-senyawa aktif dari tanaman obat akan bekerja serentak dalam menghambat pertumbuhan sel kanker sehingga lama kelamaan sel kanker akan melemah dan kemudian mati [2]. Mengingat potensi obat tradisional (obat alami) berbahan dasar tumbuh-tumbuhan telah lama dipercaya mampu menyembuhkan penyakit tertentu tanpa menimbulkan efek samping yang membahayakan, para peneliti berusaha mencari senyawa antikanker dari keanekaragaman hayati yang tersedia di Indonesia.

Indonesia merupakan negara yang terkenal memiliki hutan hujan tropika yang kaya akan keanekaragaman flora di dunia. Fransworth (1985) dalam Zuhud, *et al.*[3], menyatakan bahwa 74 % dari 121 bahan aktif obat modern di USA berasal dari pengetahuan obat tradisional yang berasal dari tumbuhan hujan tropika. Hal ini menunjukkan bahwa hutan tropika Indonesia sangat potensial mengandung berbagai senyawa bioaktif. Oleh karena itu, keanekaragaman hayati hutan tropika Indonesia adalah sumber senyawa metabolit sekunder seperti terpenoid, steroid, saponin, flavonoid, dan alkaloid, yang tak ternilai jumlah jenisnya.

Salah satu jenis tumbuhan yang banyak hidup di Indonesia dan memiliki keanekaragaman yang melimpah adalah tumbuhan paku. Pemanfaatan tumbuhan paku sebagai bahan obat

dikarenakan kemampuan tumbuhan paku memproduksi senyawa metabolit sekunder. Berdasarkan hasil penelitian fitokimia yang telah dilakukan pada beberapa spesies tumbuhan paku dapat dinyatakan bahwa tumbuhan paku mengandung berbagai senyawa bioaktif golongan terpenoid, steroid, fenilpropanoid, poliketida, flavonoid, alkaloid, stilben, santon, turunan asam benzoat, lipid, dan senyawaan belerang [4]. Sementara itu berdasarkan hasil uji bioaktivitas, beberapa metabolit sekunder dari tumbuhan paku menunjukkan aktivitas biologis yang menarik antara lain sebagai antikanker [5].

Salah satu spesies tumbuhan paku yang tersedia melimpah di Indonesia adalah *Christella arida*. Tumbuhan tersebut banyak tumbuh di daerah rawa-rawa, kolam dangkal, dan di daerah bebatuan di pingir-pinggir perairan. Tumbuhan paku *Christella arida* belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat, kecuali sebagai tanaman hias. Namun demikian pernah dilaporkan bahwa tumbuhan tersebut telah dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional di India. Penelitian kandungan kimia dan bioaktivitas tumbuhan paku tersebut belum pernah dilaporkan. Namun berdasarkan pendekatan kemotaksonomi dapat diprediksi kemungkinan adanya senyawa non fenolik golongan lipid dan steroid, serta senyawa fenolik golongan flavonoid, fenilpropanoid, dan poliketida dalam tumbuhan paku tersebut karena termasuk dalam famili Thelypteridaceae [5].

Mengingat masih terbatasnya informasi tentang kandungan kimia dan bioaktivitas dari tumbuhan paku *Christella arida*, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang kandungan metabolit sekunder dari tumbuhan tersebut, khususnya senyawa non fenoliknya serta mengevaluasi aktivitas pendahuluannya sebagai antikanker.

METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif.

Alat

Seperangkat alat ekstraksi dengan metode maserasi, seperangkat alat penyaring Buchner, *rotary vacuum evaporator*, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, seperangkat alat kromatografi cair vakum, Fisher John *melting poiny apparatus*, spektrofotometer UV Shimadzu Pharma Spec.UV-1700, spektrofotometer IR Buck 500 scientific, spektrofotometer massa Shimadzu

QP-2010S, dan alat-alat gelas yang lazim digunakan dalam laboratorium Kimia Organik.

Bahan

n-heksana teknis, etil asetat teknis dan p.a, kloroform teknis dan p.a, metanol p.a, asam sulfat pekat p.a, anhidrida asam asetat p.a, silika gel Merck G-60 (60-200 μ m), kieselgel Merck 60 GF-254, pelat KLT silika gel F-254 (20x20; 0,25 mm), dan larva udang laut *Artemia salina* L.

Prosedur Penelitian

Tahap isolasi dan identifikasi senyawa non fenolik

Sampel berupa serbuk kering bagian batang tumbuhan paku *Christella arida* sebanyak 400 gram diekstraksi dengan cara maserasi (4 x 24 jam) menggunakan pelarut *n*-heksana. Ekstrak *n*-heksana yang diperoleh diuapkan dengan *evaporator rotary vacuum* menghasilkan ekstrak padat. Ekstrak yang diperoleh diuji kualitatif menggunakan pereaksi Liebermann-Burchad, kemudian dipisahkan komponen-komponennya menggunakan metode kromatografi cair vakum (KCV) dengan menggunakan fasa diam silika gel GF-254 dengan eluen *n*-heksana, campuran *n*-heksana-etilasetat, dan asetat. Hasil pemisahan dimonitor dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan pelat KLT silika gel F-254 dengan eluen *n*-heksana-etilasetat 4 : 1. Fraksi-fraksi yang bersesuaian nilai R_f -nya dan sudah menunjukkan satu noda pada KLT digabung untuk dimurnikan dengan cara rekristalisasi. Isolat yang diperoleh diuji kemurniannya dengan penentuan titik leleh dan KLT menggunakan tiga sistem eluen. Senyawa organik yang tingkat kemurniannya sangat tinggi memiliki titik leleh yang tajam dengan rentang 0,5-1 $^{\circ}$ C [7]. Senyawa hasil isolasi yang telah dimurnikan selanjutnya diidentifikasi dengan uji kualitatif menggunakan pereaksi Liebermann-Burchad dan metode spektroskopi (UV, IR, dan MS).

Tahap uji pendahuluan aktivitas antikanker dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Sebanyak 5 mg isolat dilarutkan dalam 5 mL *n*-heksana. Larutan yang terbentuk disebut larutan induk dengan konsentrasi 1000 μ g/mL. Larutan induk kemudian dipipet sebanyak 10, 25, 50, 75, dan 100 μ L dan dimasukkan ke dalam masing-masing vial yang berbeda. Selanjutnya masing-masing vial dibiarkan sampai pelarutnya menguap.

Ke dalam masing-masing vial dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina*, kemudian ditambah air laut sampai volumenya mencapai 5 mL dan dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam dihitung jumlah larva *Artemia salina* yang mati. Hasil yang diperoleh dianalisis probit dengan menggunakan program SPSS 20 *for windows* untuk menentukan besarnya LC_{50} senyawa hasil isolasi [6].

HASIL DAN PEMBAHASAN

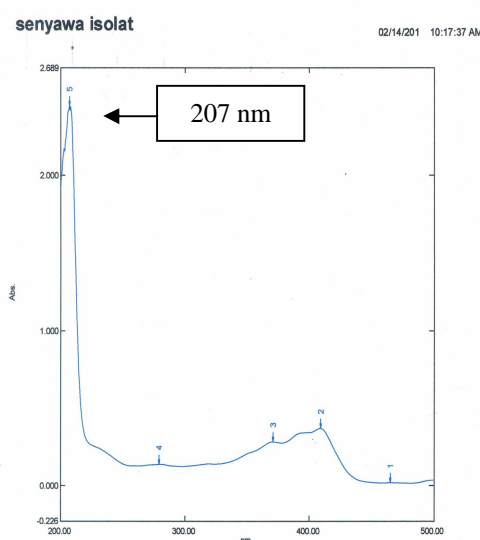
Isolasi dan Identifikasi Senyawa Non Fenolik

Ekstrak *n*-heksana yang diperoleh diuapkan secara vakum dengan *evaporator rotary vacuum* (penguap putar) menghasilkan zat padat berwarna coklat gelap sebanyak 3,556 gram.

Ekstrak padat yang diperoleh diuji pendahuluan dengan pereaksi Liebermann-Burchad yang menampakkan warna hijau kebiruan. Selanjutnya ekstrak padat yang diperoleh, dipisahkan komponen-komponennya melalui metode kromatografi cair vakum (KCV) menggunakan fasa diam silika gel GF-254 dengan eluen *n*-heksana, campuran *n*-heksana-etilasetat, dan asetat menghasilkan 139 fraksi.

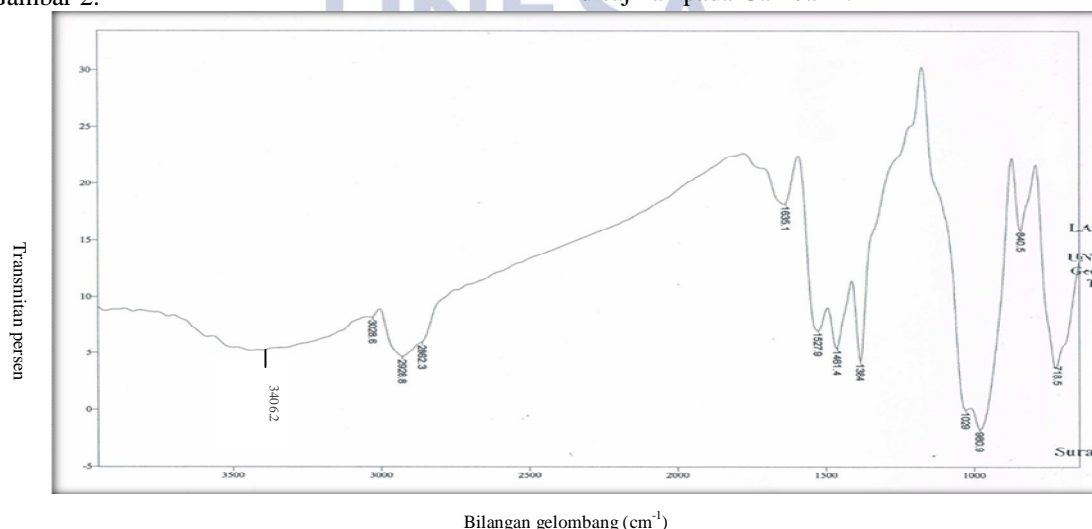
Hasil pemisahannya dimonitor dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen *n*-heksana :etilasetat = 4 : 1. Berdasarkan hasil monitoring, fraksi yang menunjukkan R_f sama pada monitor pelat KLT yaitu pada fraksi 45-62 digabung menjadi satu fraksi. Fraksi gabungan berbentuk padatan kuning sebanyak 0,395 gram yang direkristalisasi dengan menggunakan pelarut metanol menghasilkan isolat A serbuk tak berwarna seberat 0,135 gram dengan titik leleh 127-128 $^{\circ}$ C. Berdasarkan hasil titik leleh isolat yang memiliki interval 1 $^{\circ}$ C, maka isolat tersebut memiliki tingkat kemurnian yang tinggi. Hal tersebut juga didukung dengan hasil uji kemurnian dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) tiga sistem eluen dengan perbandingan *n*-heksana : etilasetat; *n*-heksana : metanol; dan *n*-heksana : kloroform (H : E; H :M dan H : K). Pengujian dengan KLT tiga sistem eluen tersebut menunjukkan hasil berupa satu noda berwarna ungu dengan R_f masing-masing 0,7857; 0,5714; dan 0,2857. Isolat menunjukkan perubahan warna menjadi biru kehijauan dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard, yang menunjukkan bahwa isolat tersebut merupakan positif senyawa golongan steroid.

Data spektrum Uv-Vis hasil senyawa isolasi terdapat puncak dengan serapan maksimum pada daerah panjang gelombang 207 nm yang dapat dilihat pada Gambar 1. Data spektrum Uv-vis tersebut menunjukkan adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ yang menyatakan terdapat ikatan rangkap C=C dan menunjukkan tidak adanya ikatan rangkap terkonjugasi dalam senyawa hasil isolasi.



Gambar 1. Spektrum UV-Vis Isolat A

Data hasil spektrum IR senyawa hasil isolasi menunjukkan adanya puncak regang -OH ($3406,2$), regang C-H alkil ($2928,8$ dan $2862,3$ cm^{-1}), regang C=C ($1635,1$ cm^{-1}), dan vibrasi tekuk C-H ($1461,4$ dan 1384 cm^{-1}) yang mendukung adanya kerangka senyawa steroid dalam isolat yang ditunjukkan pada Gambar 2.

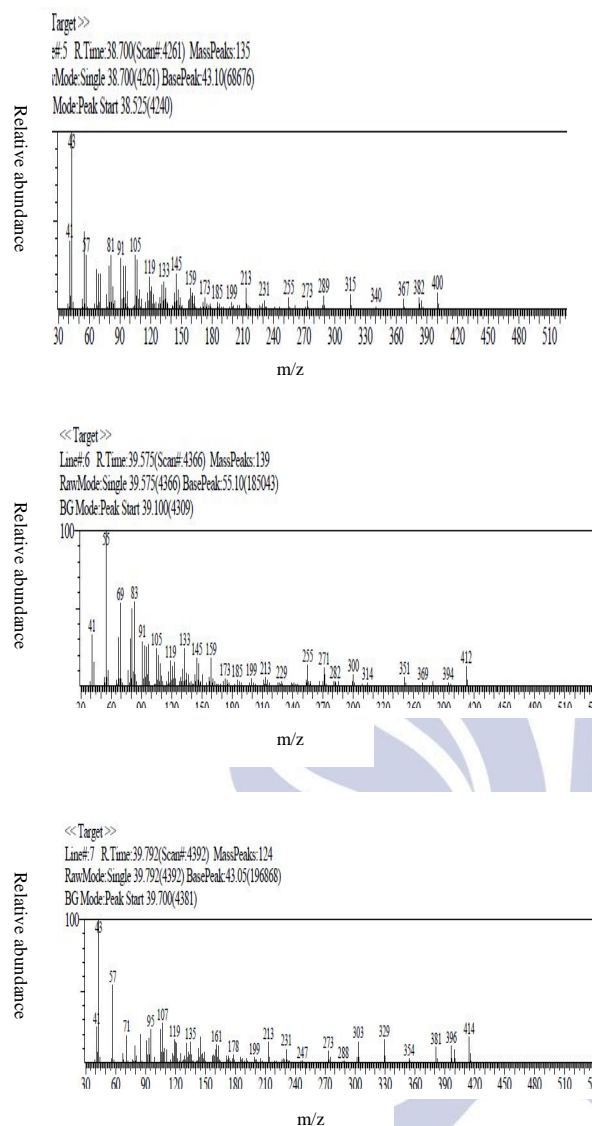


Gambar 2. Spektrum IR Isolat A

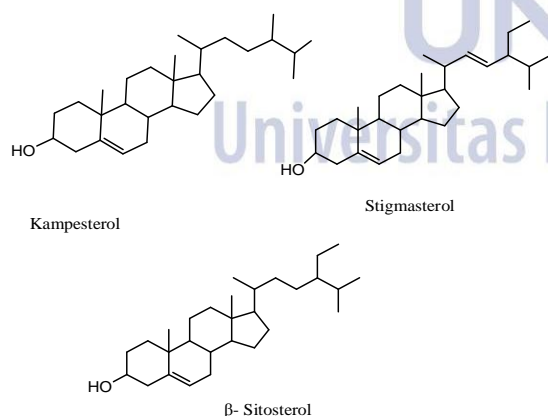
Adanya puncak pada regang $3406,2$ cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi tegang O-H dan adanya vibrasi C-O pada puncak 1029 cm^{-1} mendukung isolat tersebut menunjukkan senyawa steroid jenis sterol yang memiliki gugus hidroksil.

Berdasarkan hasil analisis dengan kromatografi gas-spektroskopi massa (GC-MS), isolat A merupakan campuran dari 3 senyawa yang masing-masing memiliki massa molekul relatif 400 (A-1), 412 (A-2), dan 414 (A-3). Isolat A-1 memberikan ion-ion fragmen pada m/z 382, 367, 340, 315, 289, 273, 255, 231, 213, 199, 185, 173, 159, 145, 133, 119, 105, 91, 81, 57, 43, dan 41. Spektrum massa isolat A-1 menunjukkan kemiripan dengan spektrum massa kampesterol. Isolat A-2 memberikan ion-ion fragmen pada m/z 394, 369, 351, 314, 300, 282, 271, 255, 229, 213, 199, 185, 173, 159, 145, 133, 119, 105, 91, 83, 69, 55, 41. Spektrum massa isolate A-2 menunjukkan kemiripan dengan spektrum massa stigmasterol. Isolat A-3 memberikan ion-ion fragmen pada m/z 396, 381, 354, 329, 303, 288, 273, 247, 231, 213, 199, 178, 161, 135, 119, 107, 95, 71, 57, 43, 41. Spektrum massa isolat A-3 menunjukkan kemiripan dengan spektrum massa β -sitosterol.

Berdasarkan perbandingan pola fragmentasi spektrum massa senyawa A-1, A-2, dan A-3 dengan data dalam library GCMS Jurusan Kimia FMIPA Universitas Gadjah Mada serta data literatur, diduga ketiga senyawa steroid tersebut masing-masing adalah kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol. Struktur senyawa hasil isolasi tersebut didukung dengan spektrum Uv-Vis dan IR dan disajikan pada Gambar 4.



Gambar 3. Spektrum MS Isolat A



Gambar 4. Struktur Senyawa Hasil Isolasi

Adanya kandungan senyawa steroid jenis kampesterol, stigmasterol dan β -sitosterol dalam tumbuhan paku *Christella arida* mendukung penelitian sebelumnya bahwa dalam tumbuhan paku famili Thelypteraceae terdapat senyawa steroid jenis β -sitosterol. Hal tersebut juga didukung oleh Nakanishi (1974), bahwa tumbuhan dengan famili yang sama kemungkinan mempunyai kandungan metabolit sekunder dengan struktur senyawa yang mirip.

Uji Pendahuluan Aktivitas Antikanker dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Dalam penelitian ini uji pendahuluan aktivitas antikanker dilakukan dengan menggunakan metode BSLT dengan hewan uji berupa larva udang laut *Artemia salina* L. yang telah berumur 48 jam. Berdasarkan hasil uji BSLT terhadap ekstrak *n*-heksana batang tumbuhan paku *Christella arida* diperoleh data yang disajikan pada Tabel 1. Sedangkan hasil uji BSLT terhadap senyawa hasil isolasi diperoleh data yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antikanker pada Ekstrak *n*-Heksana dengan BSLT

No	Kadar (ppm)	Jumlah <i>Artemia salina</i> L. Awal	Jumlah Kematian <i>Artemia salina</i> L.			% Kematian			Rata-rata %
			1	2	3	1	2	3	
1	10	10	5	5	6	50	50	60	53,3
2	25	10	7	6	6	70	60	60	66,7
3	50	10	8	8	8	80	80	80	80
4	75	10	9	9	9	90	90	90	90

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antikanker pada Isolat dengan BSLT

No	Kadar (ppm)	Jumlah <i>Artemia salina</i> L. Awal	Jumlah Kematian <i>Artemia salina</i> L.			% Kematian			Rata-rata %
			1	2	3	1	2	3	
1	10	10	6	6	7	60	60	70	63,3
2	25	10	7	6	7	70	60	70	66,7
3	50	10	8	8	7	80	80	70	76,6
4	75	10	8	8	8	80	80	80	80
5	100	10	9	9	9	90	90	90	90

Hasil uji ekstrak *n*-heksana tumbuhan *Christella arida* dan senyawa isolat tersebut menunjukkan hasil positif terhadap aktivitas antikanker. Berdasarkan analisis probit menggunakan program SPSS 20 for windows diperoleh harga LC_{50} ekstrak sebesar 22,62 $\mu\text{g/mL}$ dan LC_{50} isolat sebesar 22,539 $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas antikanker pada tumbuhan paku *Christella arida* disebabkan oleh adanya kandungan senyawa steroid khususnya senyawa steroid jenis kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol.

Berdasarkan hasil pengujian dengan uji BSLT yang disajikan, maka senyawa isolat dapat dikategorikan sebagai zat yang toksik karena besarnya nilai LC_{50} senyawa kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol terletak kurang dari 200 $\mu\text{g/mL}$. Oleh karena itu senyawa tersebut memiliki potensi untuk diklasifikasikan sebagai senyawa yang bersifat antikanker. Menurut Meyer, *et al.*, (1982), ekstrak bersifat toksik jika harga $LC_{50} < 1000$ mg/L, sedangkan untuk senyawa murni jika $LC_{50} < 200$ mg/L. Namun demikian, untuk dapat lebih memastikan besar aktivitas antikanker dari senyawa isolat diperlukan pengujian langsung pada sel kanker.

PENUTUP

Simpulan

1. Senyawa steroid yang terkandung pada isolat dari bagian batang tumbuhan paku *Christella arida* diduga merupakan campuran senyawa steroid yaitu kampesterol (ergoster-5-en-3-ol) dengan rumus molekul $C_{28}H_{48}O$, stigmasterol (stigmast-5,22-dien-3-ol) dengan rumus molekul $C_{29}H_{48}O$, dan β -sitosterol (stigmast-5-en-3-ol) dengan rumus molekul $C_{29}H_{50}O$ dan diperoleh serbuk tak berwarna seberat 0,135 gram dengan titik leleh 127 – 128 °C.
2. Ekstrak *n*-heksana *Christella arida* dan isolatnya yang terdiri dari senyawa campuran steroid positif memiliki aktivitas sebagai antikanker pada uji pendahuluan dengan metode BSLT menggunakan larva *Artemia salina* L. Hal tersebut dibuktikan dengan nilai LC_{50} ekstrak sebesar 22,62 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai LC_{50} isolat sebesar 22,539 $\mu\text{g/mL}$.

Saran

1. Melakukan penelitian isolasi dan identifikasi lebih lanjut pada tumbuhan paku *Christella arida* sehingga didapatkan senyawa-senyawa lain dalam upaya pengembangan ilmu fitokimia dan kemotaksonomi tumbuhan paku khususnya *Christella arida*.
2. Melakukan pengujian lebih lanjut dalam menentukan kekuatan aktivitas antikanker senyawa steroid hasil isolasi dengan melakukan uji langsung pada sel kanker dan pengujian secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

1. NCI. 2012. *Cancer Treatment*. <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment.html>. diakses tanggal 11 April 2013
2. Difa, R. dan Suyatno. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Non Fenolik Ekstrak *n*-Heksana Tumbuhan Paku Kamuding (*Adiantum Philippensis* L.) serta Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. Surabaya, 25 Februari.
3. Zuhud, E.A.M. 2009. Potensi Hutan Tropika Indonesia sebagai Penyangga Bahan Obat Alam untuk Kesehatan Bangsa. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*. 6.227-232.
4. Suyatno. 2011. Keragaman Kimiawi dan Bioaktivitas Metabolit Sekunder dari Tumbuhan Paku (*Peridophyta*). *Seminar Nasional Kimia*. Jurusan Kimia Universitas Negeri Surabaya.
5. Suyatno. 2008. Senyawa Metabolit Sekunder dari Tumbuhan Paku *Chingia sakayensis* (Zeiller) Holt dan Aktivitas Sitotoksiknya terhadap Sel Murine Leukimia P-388 secara *in vitro*. *Disertasi*. Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
6. Mc Laughlin, J.L., Chang, Ching-Jer & Smith, D.L. 1991. *The Unesco Regional Workshop on the Bioassay of Natural Product with Special Emphasis on Anticancer Agent*. UM Malaysia.
7. Adam, S.R., Jonhson, J.R., Wilcox, C.F. 1970. *Laboratory Experiment Inorganic Chemistry*. 6th Ed., London: The Macmillan Company. 76-78.
8. Nakanishi, K. 1974. *Natural Products Chemistry*. Vol 1. Tokyo : Kodansha Scientific
9. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nicholas, D.E & Mc Laughlin, J.L. 1982. *Brine shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent*. Purdue University