

Sitotoksitas oleandrin hasil isolasi dari daun *Nerium indicum* Mill. terhadap beberapa kultur sel kanker manusia

Cytotoxicity of oleandrin isolated from the leaves of *Nerium indicum* Mill. on several human cancer cell lines

Mae S.H.Wahyuningsih¹⁾, Sofia Mubarika¹⁾, R.L.H. Bolhuis²⁾, K. Nooter²⁾, Ibnu G. Gandjar³⁾, Subagus Wahyuono³⁾

¹⁾ Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

²⁾ Erasmus Medical Center, Rotterdam, the Netherlands

³⁾ Fakultas Farmasi universitas Gadjah Mada

Abstrak

Pencarian senyawa antikanker dari bahan alam masih terus berlangsung. Pada penelitian pendahuluan diketahui bahwa oleandrin hasil isolasi dari daun *Nerium indicum* Mill. menghambat pertumbuhan sel mieloma *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik oleandrin terhadap beberapa jenis kanker manusia. Uji sitotoksik oleandrin dilakukan terhadap tujuh sel kanker manusia secara *in vitro* dengan metode SRB. Analisis data dilakukan dengan membandingkan nilai ID₅₀ dari oleandrin terhadap ke tujuh kultur sel kanker manusia dengan kontrol positif doxorubisin dan sisplatin.

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa oleandrin mempunyai efek sitotoksik terbesar pada kanker payudara (MCF7) dengan nilai ID₅₀ = 8,85 nM.

Kata kunci: Oleandrin, sitotoksitas, sel kanker manusia, ID₅₀

Abstract

Finding anticancer drugs from natural resources still proceeds. Oleandrin isolated from *Nerium indicum* Mill. inhibited the growth of mieloma cell line *in vitro* better than that of vincristine sulphate. This study was aimed to determine the cytotoxic effect of oleandrin on various human cancer cell lines. Cytotoxic test of oleandrin on seven human cancer cell lines was done by SRB-method. The analysis was conducted by comparing the ID₅₀ of oleandrin with that of doxorubicin and cisplatin as positive controls.

This result indicated that oleandrin possessed the best cytotoxic effect on breast cancer (MCF7) with ID₅₀ at 8.85 nM.

Keywords : Oleandrin, cytotoxicity, human cancer cells, ID₅₀

Pendahuluan

Penyakit kanker merupakan penyebab kematian terbesar di dunia dan sampai saat ini belum ditemukan obat antikanker yang memuaskan hasilnya. Hal ini disebabkan karena rendahnya selektivitas obat antikanker terhadap jenis kanker tertentu. Pencarian senyawa antikanker dari bahan alam telah dilakukan dan diperoleh oleandrin dari daun *Nerium indicum* Mill. yang terbukti efektif terhadap

penghambatan sel mieloma (Wahyuningsih *et al.*, 2000b). Dapat dikatakan bahwa oleandrin berpeluang besar untuk digunakan sebagai obat antikanker baru.

Nerium indicum Mill. merupakan salah satu tumbuhan yang secara tradisional dilaporkan sebagai antikanker (Hartwel, 1982). Beberapa aktivitas lain dari daunnya telah banyak dilaporkan antara lain sebagai diuretika, antiskabies, mengobati herpes (Perry, 1980),

antiinfeksi pada mata dan kulit, antibakteri, antijamur, insektisida, bengkak dan penguat jantung (Siddiqui, *et al.*, 1997; Hembing, 1993), analgesik dan depresan susunan syaraf pusat (Zia, *et al.*, 1995), dan diperkirakan sebagai antileukemia (Boisio, *et al.*, 1993). Lebih jauh lagi Anvirzel adalah ekstrak dari *Nerium oleander* dapat menginduksi kematian sel kanker (Pathak, *et al.*, 2000). Penelitian serupa menyebutkan bahwa senyawa yang tergolong cardiac glycosides dapat menstimulasi Ca^{2+} dan menaikkan apoptosis pada kanker prostat (Mc.Conkey, *et al.*, 2000). Menurut beberapa penelitian, tumbuhan *Nerium* sp. telah dilaporkan mengandung neriodorein, neriodorin, karabin, asam tanat (Perry, 1980), kanerin dan asam 12,13-dehidroursulat (Siddiqui, *et al.*, 1989), oleandrin (Boisio, *et al.*, 1993), asam kanerat, asam nerikumarat, asam isonerikumarat, oleanderol, oleanderen, kanerodione, kanerin, neriumin, neriuminin (Begum, *et al.*, 1997), neridiginoside (Begum, *et al.*, 1999). Senyawa oleandrin berhasil diisolasi melalui ekstraksi, fraksinasi dan isolasi yang termonitor dengan BST (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan nilai $LC_{50} = 2,36 \times 10^{-6}$ M (Wahyuningsih *et al.*, 2000a). Oleandrin juga mampu menghambat pertumbuhan sel mieloma pada dosis $1,74 \times 10^{-5}$ M sebanding dengan vinkristin sulfat dosis $3,4 \times 10^{-5}$ M (Wahyuningsih *et al.*, 2000b)..

Uji sitotoksisitas merupakan pengembangan metode untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik dari bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker. Teknik sulforhodamine B (SRB) merupakan salah satu dari beberapa metode uji sitotoksik *in vitro* yang baik dan sensitive untuk memprediksi efek sitotoksik senyawa dari bahan alam (Perez *et al.*, 1993; Skehan *et al.*, 1990). Metode ini telah digunakan untuk uji aktivitas pada obat-obat antikanker yang telah digunakan secara klinis (Keepers *et al.*, 1991).

Berdasarkan atas data-data tersebut, maka oleandrin dapat dikembangkan sebagai bahan antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik oleandrin hasil isolasi dari daun *Nerium indicum* Mill terhadap beberapa sel kanker manusia *in vitro*, sehingga diharapkan dapat menemukan efek sitotoksik terbesar oleandrin terhadap jenis kanker tertentu.

Metodologi

Bahan

Oleandrin diisolasi dari daun *Nerium indicum* Mill. melalui ekstraksi, partisi, fraksinasi dan isolasi dengan KLT preparative termonitor dengan uji BST (Wahyuningsih *et al.*, 2000a), Doksorubisin (Dox) dan Sisplatin (Cpt) (Erasmus Medical Centre, the Netherlands). Tujuh jenis sel kanker manusia yaitu sel kanker payudara (MCF7), kanker paru-paru (H226), melanoma (M19), kanker kandungan (IGROV), ginjal (A498), payudara (EVSA-T) dan kanker kolon (WiDR) diperoleh dari Erasmus Medical Centre, the Netherlands. Sulforhodamine B (SRB), FBS, RPMI 1640, streptomisin, penisilin, glutamin, tris (hidroksimetil)aminometana (Tris base) dari Gibco BRL, Grand Island, New York, USA; Alkohol absolut, TCA, Kloroform, Metanol derajat pa dan diperoleh dari E-Merck.

Jalannya Penelitian

Pembuatan larutan stok

Oleandrin (1,0 mg) dilarutkan dalam dimetilsulfoksida (DMSO) (1,0 ml) sebelum ditambahkan ke dalam medium untuk kultur sel, sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok 1 mg/ml.

Kultur sel kanker

Tujuh sel kanker manusia dikultur dalam medium RPMI 1640 yang ditambah dengan 10% FBS, 100 µg/ml streptomisin, 100 unit/ml penisilin dan 2 mM glutamin. Sel diinkubasikan pada suhu 37°C dengan CO₂ sebanyak 8,5% (Boersma *et al.*, 1996)

Uji sitotoksisitas

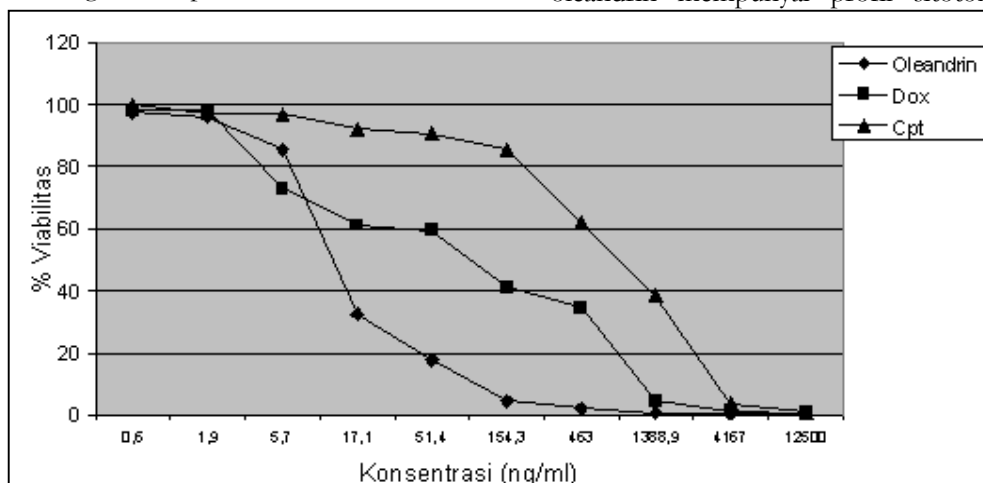
Uji sitotoksisitas dilakukan dengan metode SRB (Skehan, 1990) dengan menggunakan mikroplat (96 sumur) (Falcon, 3072 BD). Suspensi sel (150 µl) dalam tiap sumur mengandung 1500-2000 sel/sumur. Mikroplat dengan 96 sumur diinkubasikan selama 48 jam pada suhu 37°C dengan CO₂ (8,5%). Kemudian ditambahkan sampel (50 µl/sumur) dari larutan stok sehingga diperoleh konsentrasi berturut-turut sebesar 0,6; 1,9; 5,7; 17,1; 51,4; 154,3; 463,0; 1388,9; 4167 ng/ml dan 12500 ng/ml (tertinggi) (n=4). Sebagai kontrol negatif dipakai medium dan juga sel tanpa sampel sedangkan kontrol positif dipakai doksorubisin dan sisplatin. Setelah penambahan sampel mikroplat diinkubasikan pada suhu 37°C dengan CO₂ (8,5%) selama 5 hari. Medium dibuang dan larutan TCA 10% (150 µl /sumur) ditambahkan mikroplat diletakkan pada suhu 4°C selama 1 jam. TCA dibuang dan mikroplat dicuci dengan aquadest, kemudian ditambahkan 0,4% SRB dalam 1% asam

asetat (50 µl/sumur), mikroplat digoyang minimal selama 15 menit kemudian dicuci dengan 1% asam asetat dalam air. Mikroplat dikeringkan pada udara terbuka kemudian Tris Base (10 mMol, 150 µl/sumur) ditambahkan. Absorbans dibaca dengan menggunakan mikroplat "reader" pada λ sebesar 540 nm (Skehan *et al.*, 1990; Perez *et al.*, 1993)

Hasil Dan Pembahasan

Penelitian antikanker yang bertitik berat pada bagaimana mekanisme sel kanker terbunuh oleh obat-obat sitotoksik, merupakan ilmu yang berkembang saat ini. Penelitian dengan target molekul intraseluler yang diharapkan adalah target spesifik pada sel kanker dan bukan pada sel normal. Sampai saat ini belum ditemukan obat antikanker yang spesifik untuk penghambatan sel kanker saja, sehingga usaha penemuan obat baru masih terus berlanjut diantaranya dari bahan-bahan alam. Pada penelitian ini dilakukan uji sitotoksitas oleandrin hasil isolasi dari daun *N. indicum* Mill terhadap tujuh macam sel kanker manusia. Diharapkan dari penelitian ini diperoleh informasi kespesifikan oleandrin dalam menghambat pertumbuhan sel kanker.

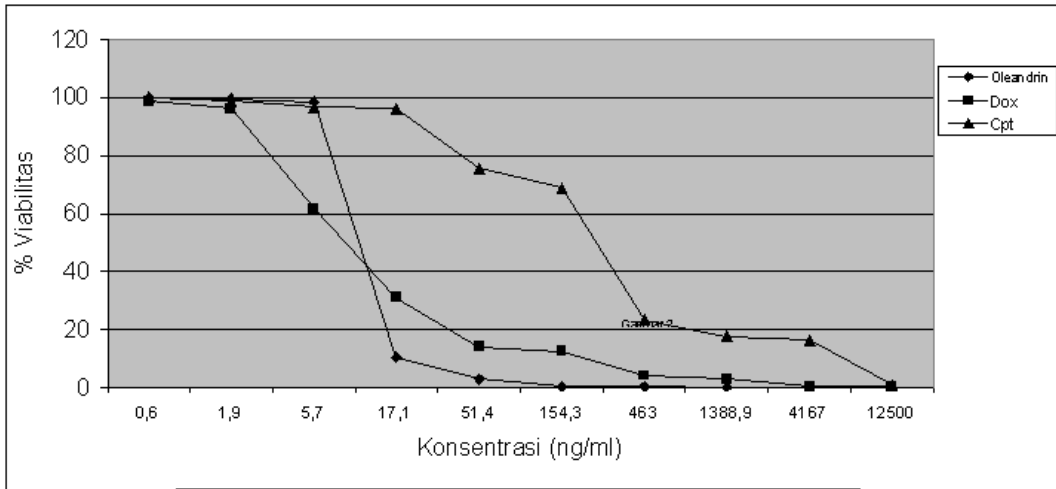
1989). Hasil uji sitotoksitas oleandrin dibandingkan dengan doksorubisin dan sisplatin untuk masing-masing sel kanker manusia (gambar 1-7). Dari hasil uji sitotoksitas dapat ditentukan jenis sel kanker tertentu yang paling sensitif terhadap oleandrin. Skehan (1990) menggunakan metode uji sitotoksitas berdasarkan adanya intensitas warna Sulforhodamine B yang terkenal dengan metode SRB. Sel yang masih hidup akan berwarna ungu setelah pemberian SRB, sedangkan sel yang mati akan tercuci hilang setelah pemberian 1% asam asetat dalam air. Pengukuran intensitas warna, profil efek dan perhitungan ID₅₀ dilakukan secara otomatis menggunakan alat mikroplat "reader". Metode ini banyak digunakan untuk mengukur daya antiproliferasi dari suatu zat terhadap sel dengan perhitungan akhir menggunakan nilai ID₅₀. ID₅₀ (*Inhibitory Dose*) adalah nilai respons yang pada dosis tertentu menimbulkan penghambatan 50% populasi sel yang sama dalam waktu yang spesifik dan kondisi percobaan yang sesuai (Rajbhandari *et al.*, 2001). Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa oleandrin mempunyai profil sitotoksik yang



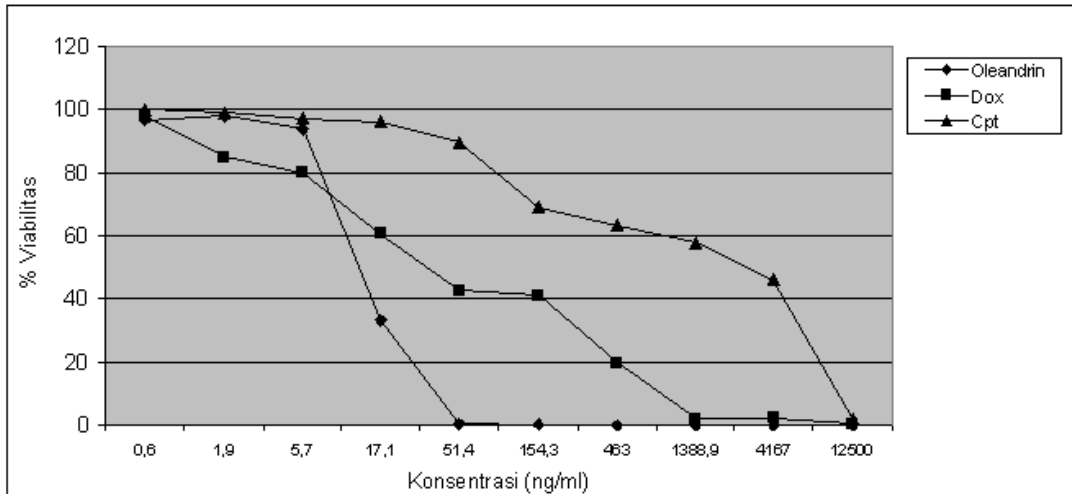
Gambar 1. Profil efek sitotoksik oleandrin, doksorubisin dan sisplatin pada sel kanker ginjal (A498)

Penentuan efek sitotoksik dilakukan dengan cara menguji oleandrin pada dosis yang sama terhadap 7 sel kanker manusia menggunakan metode yang telah digunakan oleh Skehan (1990). *Human cancer cell lines* tersebut telah dipakai untuk skrining antikanker di National Cancer Institute, USA (Boyd,

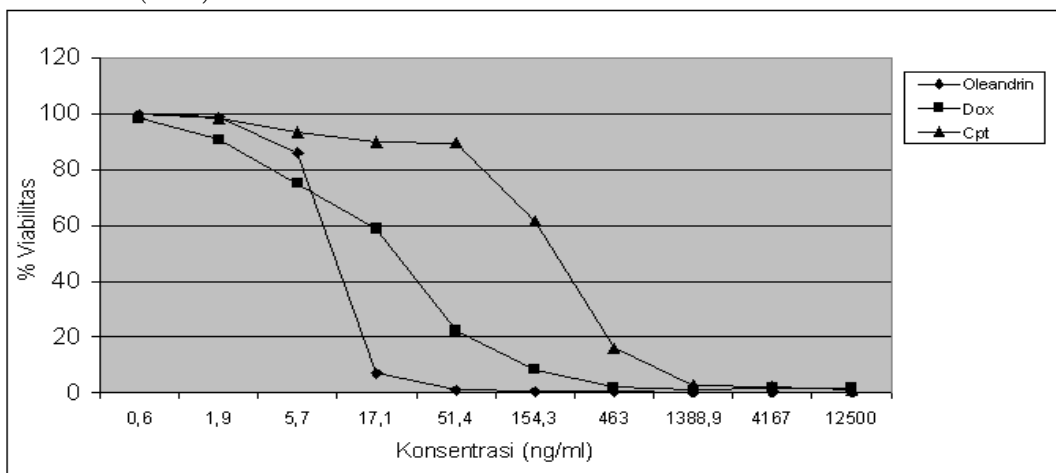
berbeda dibandingkan dengan doksorubisin dan sisplatin pada sel kanker ginjal A498 (gambar 1). Pada konsentrasi 5,7 ng/ml, persentase viabilitas sel akibat oleandrin masih sekitar 87% dan pada konsentrasi 17,1 ng/ml terjadi penurunan grafik yang tajam dengan persentase viabilitas sel sekitar 30%. Doksorubisin pada



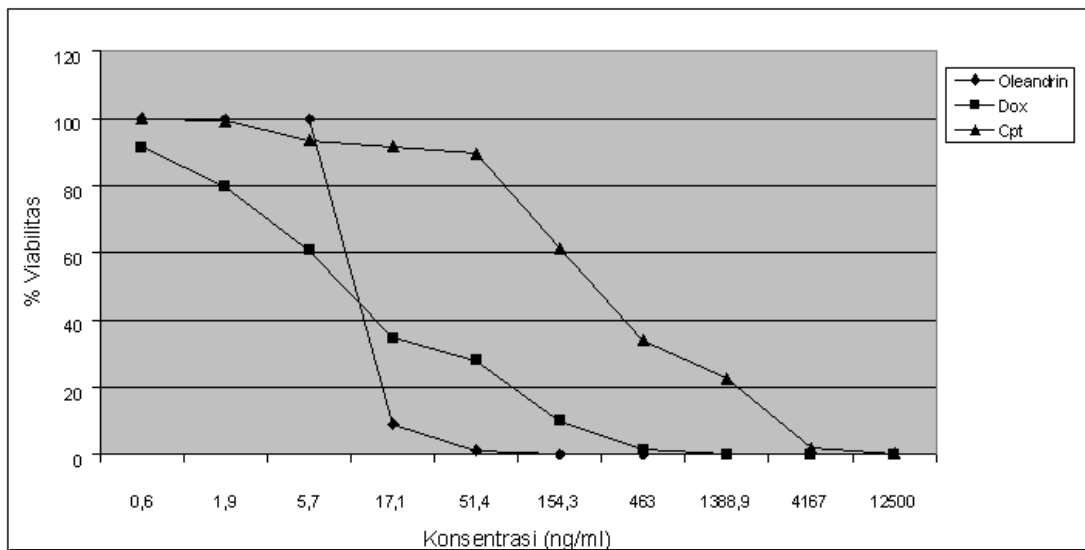
Gambar 2. Profil efek sitotoksik oleandrin, doksorubisin dan sisplatin pada sel kanker payudara (EVSA-T)



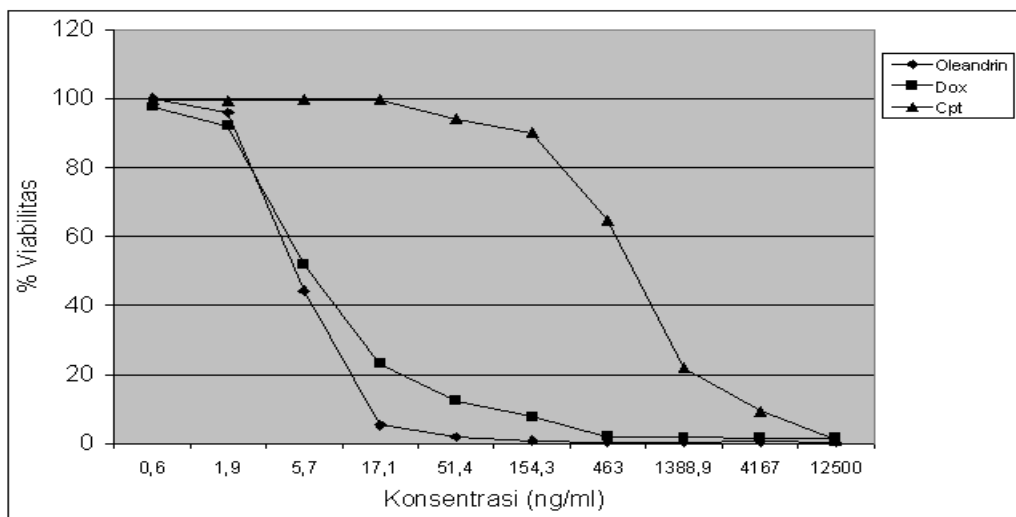
Gambar 3. Profil efek sitotoksik oleandrin, doksorubisin dan sisplatin pada sel kanker paru-paru (H226)



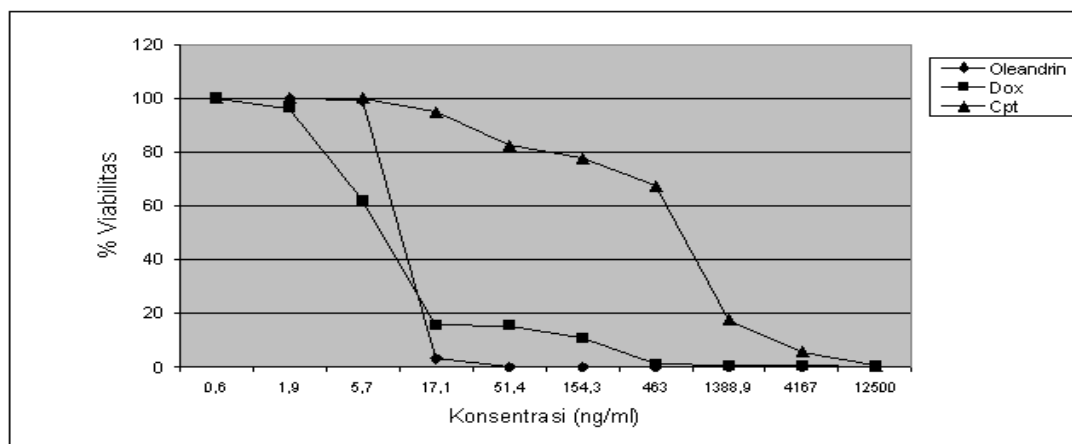
Gambar 4. Profil efek sitotoksik oleandrin, doksorubisin dan sisplatin pad sel kanker kandungan (IGROV)



Gambar 5. Profil efek sitotoksik oleandrin, doxorubisin dan sisplatin pad sel kanker Melanome (M19)



Gambar 6. Profil efek sitotoksik oleandrin, doxorubisin dan sisplatin pad sel kanker payudara



Gambar 7. Profil efek sitotoksik oleandrin, doxorubisin dan sisplatin pad sel kanker kolon (WiDR)

Tabel I. ID₅₀ (nM) dari oleandrin, doxorubicin, dan sisplatin terhadap 7 jenis sel kanker manusia *in vitro*

Cell Lines	Nilai ID ₅₀ dari bahan uji (nM)		
	Oleandrin	Doxorubicine	Cisplatin
A498	20.8	158	3490
EVSA-T	15.9	159	820
H226	22.0	229	5060
IGROV	14.2	39.5	537
M19	15.6	26.9	798
MCF7	8.85	10.7	2040
WiDR	13.9	24.5	1790

Catatan:

A498 = kanker ginjal; EVSA-T=kanker payudara;

H226 = kanker paru-paru; IGROV = kanker kandung; M19 = melanoma;

MCF7 = kanker payudara; WiDR = kanker kolon

konsentrasi yang sama tidak menunjukkan penurunan grafik yang tajam seperti oleandrin dengan persentase viabilitas 78% pada konsentrasi 5,7 ng/ml dan 60% pada konsentrasi 17,1 ng/ml. Untuk sisplatin pada kadar tersebut belum mengalami penurunan persentase viabilitas. Berdasarkan atas data perhitungan antara konsentrasi sampel dengan respon penghambatan sel A498, maka didapatkan nilai ID₅₀ oleandrin (12,0 ng/ml), dokso-rubisin (91,9 ng/ml) dan sisplatin (1047,9 ng/ml). Apabila dilihat dari profil viabilitas pada gambar 1, maka dapat dikatakan bahwa potensi ketoksikan oleandrin, dokso-rubisin dan sisplatin tergantung dari konsentrasi (*dose dependent*).

Selain sel kanker ginjal (A498) dipakai juga dua jenis sel kanker payudara yaitu (EVSA-T) dan (MCF-7). Pemilihan sel kanker ini didasarkan pada beberapa literature yang menyebutkan bahwa kanker payudara masih banyak diderita oleh masyarakat di dunia (Anonim, 1996). Perbedaan pokok kedua sel kanker payudara EVSA-T dan MCF-7 terletak pada kandungan hormon estrogen dan progesterone. Sel MCF-7 diambil dari penderita kanker payudara dengan estrogen reseptor positif (ER+) dan progesterone reseptor positif (PgR+), sedangkan sel kanker EVSA-T diambil dari penderita kanker payudara dengan estrogen

reseptor negatif (ER-) dan progesterone reseptor negatif (PgR-). Profil sitotoksik oleandrin terhadap sel kanker payudara EVSA-T (gambar 2) memperlihatkan adanya penurunan persentase viabilitas yang tajam yaitu 99% pada konsentrasi 5,7 ng/ml menjadi 10% pada konsentrasi 17,1 ng/ml. Atas dasar data perhitungan antara konsentrasi sampel dengan respon penghambatan sel EVSA-T didapatkan nilai ID₅₀ oleandrin (9,2 ng/ml), dokso-rubisin (9,2 ng/ml) dan sisplatin (246 ng/ml).

Pada uji sitotoksik oleandrin terhadap sel kanker paru-paru (H226) (gambar 3) terlihat bahwa oleandrin menyebabkan penurunan persentase viabilitas hampir sama dengan profil pada sel kanker ginjal (A498), menjadi 30% pada konsentrasi 17,1 ng/ml. Sedangkan pada dokso-rubisin dan sisplatin penurunan persentase viabilitas sel tidak terlalu tajam. Berdasarkan atas data perhitungan antara konsentrasi sampel dengan respon penghambatan sel maka didapatkan nilai ID₅₀ oleandrin (12,7 ng/ml), dokso-rubisin (133 ng/ml) dan sisplatin (1517,8 ng/ml).

Profil kurva oleandrin pada sel kanker kandung IGROV (gambar 4) memperlihatkan penurunan viabilitas yang tajam pada konsentrasi 5,7 ng/ml (95%) dan 17,1 ng/ml (5%). Hal ini juga terlihat pada dokso-rubisin dan sisplatin, akan tetapi penurunan persentase

viabilitasnya tidak setajam oleandrin. Nilai ID_{50} oleandrin, doksorubisin dan sisplatin terhadap sel IGROV masing-masing adalah 8,2 ng/ml, 22,9 ng/ml dan 161,2 ng/ml.

Terhadap sel kanker kulit atau melanoma M19 (gambar 5) oleandrin menyebabkan penurunan persentase viabilitas lebih tajam dibandingkan dengan doksorubisin dan sisplatin, dari 100% pada konsentrasi 5,7 ng/ml menjadi 8% pada konsentrasi 17,1 ng/ml dengan nilai ID_{50} oleandrin (9,0 ng/ml), doksorubisin (15,6 ng/ml) dan sisplatin (239,5 ng/ml).

Terhadap sel kanker payudara (MCF7) oleandrin menyebabkan penurunan persentase viabilitas yang hampir sama dengan doksorubisin. Pada konsentrasi 1,9 ng/ml persentase viabilitas sebesar 98% menurun sampai 5% untuk oleandrin dan 22% untuk doksorubisin pada konsentrasi 17,1 ng/ml. Sedangkan untuk sisplatin pada konsentrasi yang sama, persentase viabilitasnya masih 100%. Berdasarkan atas data perhitungan antara konsentrasi sampel dengan respon penghambatan sel, maka didapatkan nilai ID_{50} oleandrin (5,1 ng/ml), doksorubisin (6,2 ng/ml) dan sisplatin (610,9 ng/ml).

Profil viabilitas sel kanker yang ketujuh yaitu sel kanker kolon WiDR (gambar 7) memperlihatkan bahwa oleandrin pada konsentrasi 5,7 ng/ml persentase viabilitasnya masih 100% dan menurun tajam sampai 2% pada konsentrasi 17,1 ng/ml. Sedangkan pada konsentrasi 51,4 ng/ml persentase viabilitas sel sudah mencapai 0% yang berarti bahwa sel kanker tersebut sudah mati semua akibat pemberian oleandrin. Berdasarkan atas data perhitungan antara konsentrasi sample dengan respon penghambatan sel, maka didapatkan nilai ID_{50} oleandrin (8,0 ng/ml), doksorubisin (14,2 ng/ml) dan sisplatin (537,7 ng/ml).

Daftar Pustaka

- Anonim 1996. Twelve Major Cancers, *Scientific American*, 273 (3), 126-132.
- Begum, S., Sultana, R. and Siddiqui, B.S. 1997. Triterpenoids from the leaves of *Nerium oleander*, *Phytochemistry*, 44 (2) 329-332
- Begum, S., Siddiqui, B.S., Sultana, R., Zia, A. and Suria, A. 1999. Bio-active cardenolides from the leaves *Nerium oleander*, *Phytochemistry*, 50, 435-438
- Boersma A.W.M., Nooter, K., Oostrum, R.G., and Stoter, G., 1996, Quantification of apoptotic cells with Fluorescein Isothiocyanate-labeled Annexin V in chinese Hamster Ovary cell cultures treated with cisplatin, *Cytometry*, 24, 123-130

Setelah dihitung harga ID_{50} dari oleandrin, doksorubisin dan sisplatin pada masing-masing sel kanker (dalam ng/ml), data dikonversikan dalam satuan nano molar (nM). Ke tiga senyawa yang digunakan dalam uji sitotoksitas ini merupakan senyawa yang sudah diketahui berat molekulnya yaitu oleandrin (BM, 576), doksorubisin (BM, 580) dan sisplatin (BM, 300). Hasil perhitungan ID_{50} dapat dilihat pada tabel I.

Dari data nilai ID_{50} (tabel I) dapat diketahui bahwa oleandrin memperlihatkan sifat sitotoksitas paling tinggi terhadap sel kanker payudara MCF-7 jika dibandingkan dengan sel kanker lain. Nilai ID_{50} senyawa oleandrin terhadap sel MCF-7 adalah 8,85 nM, lebih kecil dibandingkan dengan senyawa kontrol doksorubisin dan sisplatin yang masing-masing mempunyai ID_{50} sebesar 10,7 nM dan 2040 nM terhadap sel yang sama.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa oleandrin (berat molekul 576), mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap 7 sel kanker manusia. Aktivitas sitotoksik oleandrin lebih besar dibandingkan dengan sisplatin dan doksorubisin. Aktivitas sitotoksik terbesar oleandrin pada sel kanker payudara (MCF7) dengan nilai $ID_{50} = 8,85$ nM.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Dep. Dik. Nas. atas bantuan dana melalui penelitian Hibah Bersaing X dan pada Erasmus Medical Center, Belanda, atas bantuan pemberian beberapa sel kanker dan fasilitas laboratoriumnya, terima kasih juga ditujukan kepada dana penelitian hibah bersaing XI.

- Boisio, M.L., Esposito, M. and Metlo, F. 1993. Separation and identifying features of the cardiac aglycones and glycosides of *Nerium oleander* L. flowers by thin-layer chromatography. *Minerva Med.*, 84(11), 627-632
- Boyd, M.R., 1989. Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screening, *Principles and Practice of oncology*, 3, 1-12
- Hartwel, J.L. 1982. *Plant Used Against Cancer*, Quarterman Publications, Inc., Lawrence, Massachusetts, p.407,
- Hembing, W.H.M. 1993. *Tanaman Berkhasiat Obat Di Indonesia*, Jilid ke-2, 74-75, Pustaka Kartini
- Keepers, Y. P., Pizao, P.E., Peters, G. J., Van Ark-Otte, J., Winograd, B., and Pinedo, H.M., 1991, Comparison of the sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTI) assays for in vitro chemosensitivity testing, *Euro. J. Cancer*, 27(7), 897-900
- Mc. Conkey, D.J., Lin, Y., Nutt, L.K., Ozel, H.Z., Newman, R.A. 2000. Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in androgen-independent metastatic human prostate adenocarcinoma cell, *Cancer Res*, 60(14), 3807-3812.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient general bioassay for active plant constituents. *J. Med. Plant. Res.*, 45, 31-34
- Pathak, S., Multani, A.S., Narayan, S., Kumar, V., Newman, R.A. 2000. Anvirzel, an extract of *Nerium oleander*, induced cell death in human but not murine cancer cells, *Anticancer Drugs*, 11(6), 455-463
- Perez, R.P., Godwin, A.K., Handel, L.M and Hamilton, T.c, 1993, A Comparison of Clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assay for determination of cisplatin cytotoxicity in Human ovarian carcinoma cell lines, *Euro. J. Cancer*, 29A(3), 395-399
- Perry, L.M. 1980. *Medicinal Plant of Southeast Asia*, 27, the MIT Press, Cambridge, Massachusetts
- Rajbhandari, M., Wegner, U., Julich, M., Schopke, T., Mentel, R., 2001, Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 251-255.
- Siddiqui, S., Begum, S., Siddiqui, B.S. and Hafeez, Z. 1989. Kanerin and 12-13- dihydrousolic acid, two new pentacyclic teriterpenes from the leaves of *nerium oleander*, *J. Nat. Prod.*, 52 (1), 57-62
- Siddiqui, B.S., Sultana, R., Begum, B.S., Zia, A., and Suria, A. 1997. Cardenolides from the methanolic extract of *Nerium oleander* leaves possessing central nervous system depressant activity in mice, *J. Nat. Prod.*, 60, 540-544
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., and Boyd, R.M. 1990. New Colorimetric cytotoxicity assay for anticancer- drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107-1112.
- Wahyuningsih, M.S.H., Wahyuono, S., Artama, W.T., 2000a). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Bioaktif dari daun *Nerium indicum* Mill. *Majalah Farmasi Indonesia* 11(2), 86-95
- Wahyuningsih, M.S.H., Wahyuono, S., Artama, W.T., 2000b). Efek Sitotoksik Oleandrin, Senyawa Bioaktif Hasil Isolasi dari daun *Nerium indicum* Mill. Terhadap Sel Mieloma. *Berkala Ilmu Kedokteran* 32(4), 235-241
- Zia, A., Siddiqui, B.S., Begum, S., Siddiqui, S., and Suria, A. 1995. Studies on the constituents of the leaves of *Nerium oleander* on behavior pattern in mice, *J. Ethnopharmacol.*, 49 (1), 33-39.